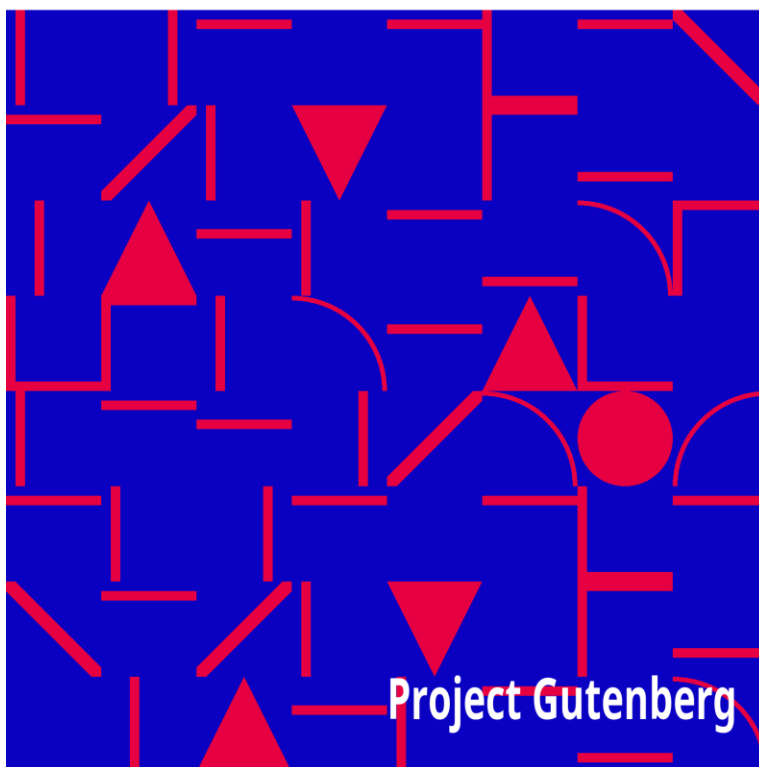


Элементы бактериологической
методики. Лабораторное руководство
для студентов медицинских,
стоматологических и технических
специальностей. Второе издание,
переписанное и дополненное

Дж. У. Х. Эйр

The Elements of Bacteriological Technique

J. W. H. Eyre



Электронная книга проекта "Гутенберг", посвященная элементам бактериологической методики

Эта электронная книга предназначена для использования любым человеком в любой точке Соединенных Штатов и в большинстве других частей мира бесплатно и практически без каких-либо ограничений. Вы можете скопировать его, раздать или повторно использовать в соответствии с условиями лицензии Project Gutenberg, прилагаемой к этой книге, или онлайн по адресу www.gutenberg.org. Если вы находитесь за пределами Соединенных Штатов, вам необходимо ознакомиться с законами страны, в которой вы находитесь, прежде чем использовать эту электронную книгу.

Название: Элементы бактериологической методики

Автор: Дж. У. Х. Эйр

Дата выхода: 5 января 2009 [Электронная книга №27713]

Язык: Английский

Кредиты: Электронный текст подготовлен Сюзанной Либарджер, Брайаном Джейнсом, Жозефиной Паолуччи и командой онлайн-корректоров Project Gutenberg

*** НАЧАЛО ПРОЕКТА "ЭЛЕКТРОННАЯ КНИГА ГУТЕНБЕРГА " ЭЛЕМЕНТЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ " ***

Электронный текст подготовлен Сюзанной Либарджер, Брайаном Джейнсом, Джозефиной Паолуччи и командой онлайн-корректоров Project Gutenberg (<http://www.pgdp.net>)

Примечание переписчика:

Для чисел и уравнений: добавлены круглые скобки для пояснения дробей.

Исправлены незначительные опечатки.

ЭЛЕМЕНТЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА

ЛАБОРАТОРНОЕ РУКОВОДСТВО ДЛЯ СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКИХ, СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ И ТЕХНИЧЕСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ

АВТОР Дж. У. Х. ЭЙР, доктор медицины, M.S., F.R.S. (ред.)

Директор бактериологического отделения больницы Гая, Лондон, и преподаватель бактериологии в медицинской и стоматологической школах; ранее преподавал бактериологию в медицинской школе больницы Чаринг-Кросс и бактериолог в больнице Чаринг-Кросс; в настоящее время профессор-хантерианец Королевского колледжа хирургов, Англия

ВТОРОЕ ИЗДАНИЕ, ПЕРЕПИСАННОЕ И ДОПОЛНЕННОЕ

ФИЛАДЕЛЬФИЯ И ЛОНДОН
КОМПАНИЯ У. Б. СОНДЕРСА
1913

Авторское право, 1902, У. Б. Сондерс и Компания Переработано, полностью сброшено, перепечатано и повторно скопировано июль 1913 г.

Авторское право, 1913, У. Б. Сондерс Компани,

Зарегистрирована в Stationers 'Hall, Лондон, Англия

НАПЕЧАТАНО В АМЕРИКЕ

ТИПОГРАФИЕЙ У. Б. СОНДЕРС КОМПАНИ,
ФИЛАДЕЛЬФИЯ

ПАМЯТИ

ДЖОНА УИЧЕНФОРДА УОШБОРНА, CMG, доктора медицины, F.R.C.P.

Врача больницы Гая, лектора по бактериологии в
Медицинской школе и врача Лондонской лихорадочной больницы

ПРЕДИСЛОВИЕ К ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

Бактериология - это, по сути, практическое исследование, и даже элементам ее техники можно обучиться только путем личного инструктажа в лаборатории. Это самоочевидное утверждение, которое не нуждается в подчеркивании, и все же я рискну предположить, что прежний набор испытанных методов уже принес некоторую пользу не только ученику в отсутствие его учителя, но и изолированным работникам в лабораториях, удаленных от центров обучения, напоминая им о забытых деталях уже освоенных методов. Если это предположение основано на факте, то не требуется дальнейших извинений за настоящее пересмотренное издание, в котором изменения носят в основном характер дополнений, ставших необходимыми из-за внедрения новых методов в последние годы.

Я пользуюсь этой возможностью, чтобы выразить свое глубокое чувство долга моему коллеге с физиологического отделения нашей медицинской школы — мистеру Дж. Х. Риффелу, доктору медицинских наук, который отредактировал эти страницы, посвященные анализу продуктов метаболизма бактерий; сменявшим друг друга коллегам из бактериологического отделения больницы Гая за их готовность сотрудничать в разработке или тестировании новых методов; и, наконец, моему главному лаборанту мистеру Дж. К. Тернеру, чья помощь и опыт были для меня чрезвычайно ценны при подготовке этого тома. Я также должен поблагодарить миссис Констант Пондер за многие новые линейные рисунки и за перерисовку ряда оригинальных вырезков.

Джон В. Х. Эйр.

Больница Гая, Южная Каролина
июль 1913 года.

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

На следующих страницах я попытался кратко и сжато изложить различные методы, используемые в настоящее время для изучения бактерий, и прояснить те моменты в истории их жизни, которые являются спорными или все еще не определены.

Из этих методов некоторые являются новыми, другие - нет; но все они надежны, были включены только те, которые способны дать удовлетворительные результаты даже в руках новичков. Фактически, основная часть материала представляет собой просто переработку машинописных заметок, раздаваемых на некоторых моих лабораторных занятиях по практической и прикладной бактериологии; следовательно, была предпринята попытка представить элементы бактериологической техники в их логической последовательности.

Я не приношу извинений за место, отведенное иллюстрациям, почти все из которых были подготовлены специально для этого тома; ибо рисунок, если он хороший, имеет более высокую образовательную ценность и передает более точное впечатление, чем страница печатного текста; и даже эскизы приборов служат определенной цели, предлагая студенту те изменения, которые могут оказаться необходимыми или целесообразными в зависимости от характера его лабораторного оборудования.

Превосходную и подходящую терминологию, введенную Честером в его недавней работе по "Детерминативной бактериологии", я принял полностью, поскольку считаю, что ее нужно использовать только для убеждения в ее чрезвычайной полезности, в то время как ее включение в элементарное руководство рассчитано на то, чтобы привить учащимся привычку к точному наблюдению и краткому описанию.

За исключением раздела XVII — "Основы изучения патогенных бактерий", — представленного с целью дополнить книгу с точки зрения студента-медика и стоматолога, работа была организована таким образом, чтобы студент-техник в целом мог использовать ее в качестве лабораторного пособия, будь то пивоварение, молочное производство или сельское хозяйство.

Я настолько хорошо осознаю ее многочисленные недостатки, что кажется почти излишним утверждать, что книга ни в коем случае не претендует на то, чтобы соперничать со многими превосходными руководствами по бактериологии, используемыми в настоящее время, а направлена лишь на то, чтобы дополнить обычно скудные сведения о технике и проинструктировать студента, как устанавливать и приспособлять оборудование для своей повседневной работы и как тщательно и систематически выполнять различные бактериоскопические анализы, которые гигиенист ежедневно требует от бактериолога.

Наконец, я с большим удовольствием отмечаю ценную помощь, полученную от моего покойного ассистента, г-на Дж. Б. Галла, А. I. С., в подготовке раздела, посвященного химическим продуктам жизнедеятельности бактерий, который был основан на работе Леманна.

Джон У. Х. Эйр.

Больница Гая, Южная Каролина

Содержание

Страница

I. Лабораторные правила 1

II. Стекланные приборы общего пользования 3

Выбор, подготовка и уход за
стеклянной посудой, 8—Чистка стеклянных
приборов, 18—Закупорка пробирок и
колб, 24.

III. Способы стерилизации 26

Стерилизующие средства, 26—Способы
применения, 27—
Часы синхронизации электрического сигнала, 38.

IV. Микроскоп 49

Основы, 49—Принадлежности, 57—Методы
микрометрии, 61.

V. Микроскопическое исследование бактерий и других микробов, 69

Приборы и реагенты, используемые при обычном
микроскопическом исследовании, 69—Методы
исследования, 74.

VI. Методы окрашивания 90

Бактериальных пятен, 90— контрастных пятен,
93—Тканевых пятен, 95—Пятен крови,
97— Методов демонстрации структуры
бактерий, 99— Дифференциальных методов
окрашивания, 108.

VII. Методы демонстрации бактерий в тканях, 114

Метод замораживания, 115—Парафиновый метод,
117— Специальные методы окрашивания
срезов, 121.

VIII. Классификация грибов 126

Морфология гифомицетов,

126—морфология бластомицетов,
129.

IX. Анатомия шизомицетов, 131

Анатомия, 134—физиология,
136—биохимия, 144.

X. Питательные среды, 146

Мясной экстракт, 148—Стандартизация
сред, 154—Фильтрация сред,
156—Хранение сред навалом, 159—
Питательные среды в трубках, 160.

XI. Обычные или исходные питательные среды 163

XII. Специальные питательные среды 182

XIII. Инкубаторы 216

XIV. Способы выращивания 221

Аэробные, 222—анаэробные, 236.

XV. Методы изоляции 248

XVI. Методы идентификации и исследования 259

Схема исследования, 259—Макроскопическое
исследование культивирования,
261—Микроскопические методы,
272—биохимические методы, 276—Физические
методы, 295—Методы инокуляции,
315—Иммунизация, 321—Активная
иммунизация, 322— Приготовление
гемолитической сыворотки, 327—Титрование
гемолитической сыворотки, 328—Хранение

Хемолизин, [331](#).

XVII. Экспериментальная прививка животных, [332](#)

Отбор и уход за животными,
[335](#) —Методы прививки, [352](#).

XVIII. Изучение экспериментальных инфекций в течение жизни [370](#)

Общих наблюдений, [371](#)—анализы
крови, [373](#)—Серологические
исследования, [378](#)—Агглютинин,
[381](#)—опсонин, [387](#)—Иммунный организм, [393](#).

XIX. Посмертное обследование экспериментальных животных [396](#)

XX. Изучение патогенных бактерий [408](#)

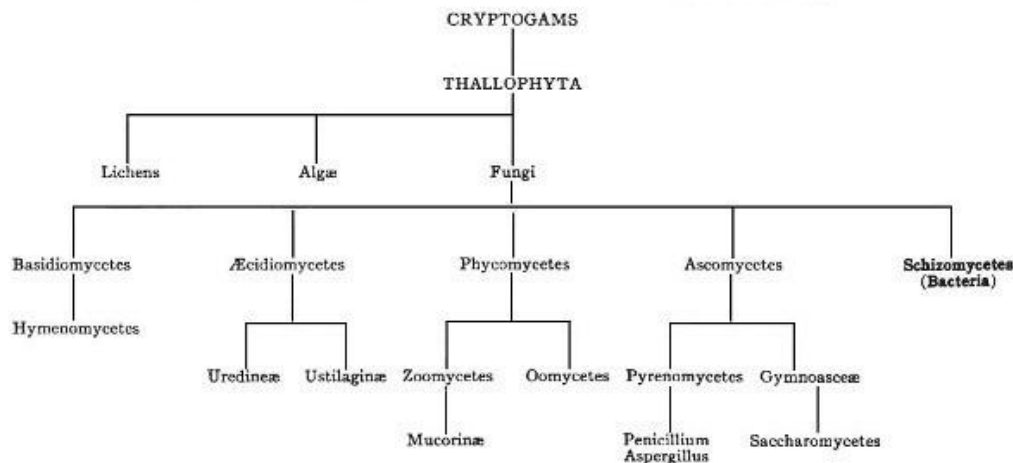
XXI. Бактериологические анализы [415](#)

Бактериологическое исследование воды,
[416](#)—Исследование молока, [441](#)—мороженого,
[457](#)— Исследование сливок и сливочного масла,
[457](#)— Исследование некачественного мяса,
[460](#)— Исследование устриц и других
моллюсков, [463](#)— Исследование сточных вод и
канализационных стоков, [466](#)—Исследование
воздуха, [468](#)—Исследование почвы,
[470](#)—Тестирование фильтров, [478](#)—Тестирование
Дезинфицирующие средства, [480](#).

Приложение [492](#)

Индекс [505](#)

THE POSITION OF BACTERIA IN THE VEGETABLE KINGDOM



БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД.

I. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРАВИЛА.

Следующие правила установлены для соблюдения в Бактериологических лабораториях под руководством автора. Аналогичные правила должны соблюдаться во всех лабораториях, где изучаются патогенные бактерии.

Больница Гая.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ.

ОБРАЩЕНИЕ С ИНФЕКЦИОННЫМИ МАТЕРИАЛАМИ.

Следующие Правила были разработаны в интересах сотрудников Лаборатории, а также общественности в целом и будут строго соблюдаться.

Их цель - избежать опасности заражения, которая может возникнуть из-за пренебрежения необходимыми мерами предосторожности или небрежности.

Каждый должен помнить, что, пренебрегая изложенными общими правилами, он не только подвергает себя серьезному риску, но и представляет опасность для других.

ПРАВИЛА.

1. Каждый работник должен носить халат или комбинезон, предоставленные за его счет, которые должны храниться в Лаборатории.
 2. Руки необходимо продезинфицировать лизолом 2%. раствор карболовой кислоты 5%. раствор или сублимат 1 промилле агрессивного вещества после контакта с инфекционным материалом и **перед использованием полотенец**.
 3. Ни в коем случае нельзя использовать лабораторные полотенца или тряпки для вытирания инфекционного материала, а в случае загрязнения таких полотенец или тряпок их необходимо немедленно простерилизовать кипячением.
 4. Для сбора любых отходов предусмотрены специальные ведра с дезинфицирующим средством, и ничего нельзя бросать на пол.
 5. Все инструменты должны быть обожжены, прокипячены или иным образом продезинфицированы сразу после использования.
 6. Этикетки следует смачивать водой, а не через рот.
 7. Все заброшенной обложке-очки, слайды, и пипетки после использования при обращении с инфекционным материалом и т. д., должны быть размещены в 2 процента. раствор лизола. Для этой цели на каждом столе имеется сосуд.
 8. Все планшетные и пробирные культуры патогенных организмов после обработки должны быть помещены для немедленной дезинфекции в коробки, предусмотренные для этой цели.
 9. Запрещается сливать жидкости в раковины или канализацию без предварительной дезинфекции.
 10. Животных следует препарировать только после того, как они прибиты гвоздями к деревянным доскам, а их кожа тщательно промыта дезинфицирующим раствором.
 11. Сразу после завершения вскрытия каждый труп должен быть помещен в цинковый ящик для животных -не снимая тушу с доски для вскрытия- и крышка ящика должна быть заменена, и он должен быть готов к транспортировке в деструктор.
 12. Мертвые животные после того, как с ними покончено, кремируются в деструкторе, и лаборант должен быть уведомлен, когда тела будут готовы к кремации.
 13. Никому из работников лаборатории не разрешается входить в помещения для содержания животных без сопровождения специального ответственного сотрудника, который должен скрупулезно соблюдать те же указания относительно личной дезинфекции, что и работники лабораторий.
 14. Никакие культуры не должны выноситься из лаборатории без разрешения заведующего отделением.
 15. Обо всех несчастных случаях, таких как разбрызгивание инфицированного материала, порезы или уколы пальцев, необходимо немедленно сообщать ответственному бактериологу.
-

II. СТЕКЛЯННЫЕ ПРИБОРЫ ОБЩЕГО ПОЛЬЗОВАНИЯ.

Оборудование бактериологической лаборатории, что касается стеклянных приборов, мало чем отличается от оборудования химической лаборатории, и чистота оборудования не менее важна. Посуда, включенная в следующий список, помимо того, что должна быть чистой, должна храниться в стерильном или свободном от микробов состоянии.

Пробирки.—Удобно иметь на складе пробирки нескольких размеров для удовлетворения особых требований, а именно:

1. **18 × 1,5** см, чтобы содержать среду для обычного выращивания в пробирке.
2. **18 × 1,3** см, чтобы содержать среды, используемые для культивирования на разливных пластинах, а также для хранения стерильных "тампонов".
3. **18 × 2** см, чтобы внутри были дольки картофеля, свеклы или других овощных субпродуктов.
4. **13 × 1,5** см, чтобы содержать сгущенную сыворотку крови.

Пробирки должны быть изготовлены из лучшего немецкого калийного стекла с "голубой подкладкой", прочные и тяжелые, с краем горловины, *слегка* загнутым, но не до такой степени, чтобы образовывался четкий ободок. (Стоит около 1,50 доллара, или 6 шиллингов за брутто.) Такие пробирки, это правда, дороги, но они достаточно прочны, чтобы выдерживать грубое обращение, обычно не ломаются при случайном падении (что случается в определенный момент, когда имеешь дело с культурами патогенных бактерий), их можно чистить, стерилизовать и использовать снова и снова, а их длительный срок службы полностью оправдывает первоначальные затраты.

Следует отметить, что производители редко выпускают такие трубки, как эти, абсолютно однородные по калибру, и партию размером 18 на 1,5 см. трубки обычно бывают таких экстремальных размеров, как 18 на 2 см и 18 на 1,3 см. Следовательно, если для сравнения сохраняется набор стандартных трубок или используются штангенциркули, то каждая новая поставка так называемых трубок 18 на 1,5 см. Их можно легко разделить на эти три размера и, таким образом, упростить заказ.

5. **5 × 0,7** см, для использования в перевернутом положении внутри пробирок, содержащих углеводную среду, в качестве газосборных пробирок.

Эти трубки без оправы могут быть изготовлены из обычного тонкого стекла с содержанием менее двух процентов. пригодны для повторного использования.

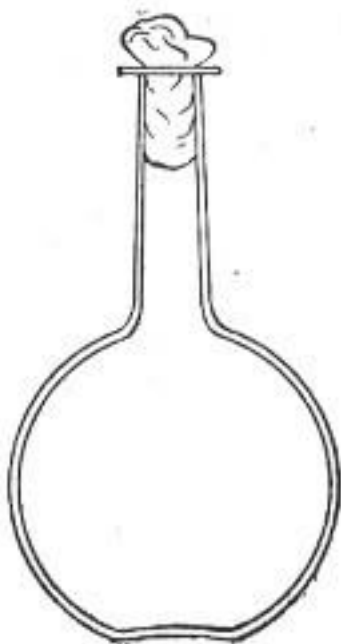


Рис. 1. богемская фляга.



Рис. 2. Колба грушевидной формы.

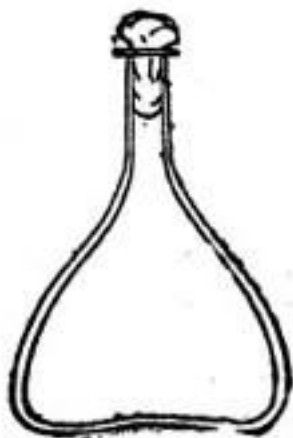


Рис. 3. Колба Эрленмейера (узкое горлышко).

Чешские колбы (рис. 1). — Это обычные колбы химической лаборатории. Хороший сорт, рассчитанный на температуру от 250 до 3000 °с, следует держать под рукой. Модифицированная форма, известная как "грушевидная" (рис. 2), предпочтительна для меньших размеров - т.е. 250 и 500 гр.

Колбы Эрленмейера (рис. 3).—Колбы Эрленмейера емкостью 75, 100 и 250 °с чрезвычайно полезны. Для использования в качестве культуральных колб следует выбирать только те, которые имеют узкое горлышко длиной около 2 см.

Культуральные колбы Kolle (рис. 4).—Эти тонкие плоские колбы (для хранения агара или желатина, которым дают затвердеть в виде слоя с одной стороны) чрезвычайно полезны из-за большой поверхности питательных веществ, доступной для роста. Поверхностное культивирование в одном из них даст такой же прирост, как у десяти или двенадцати "косых" трубчатых культур. Широкое горлышко, однако, является недостатком, и для многих целей предпочтительнее использовать тонкие плоские флаконы для культивирования, известные как **флаконы Ру** (рис. 5).

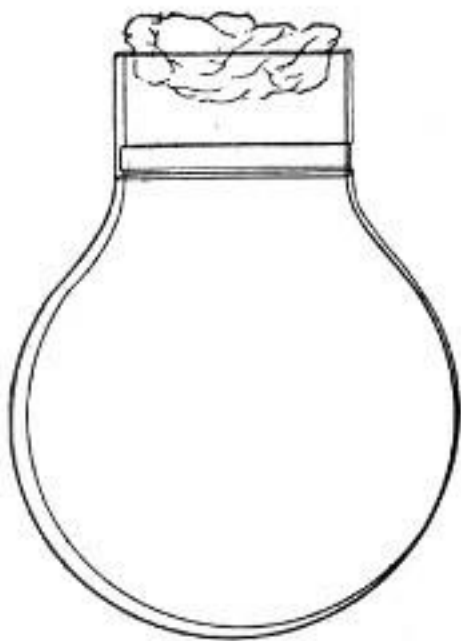


Рис. 4. Культуральная колба Колле.

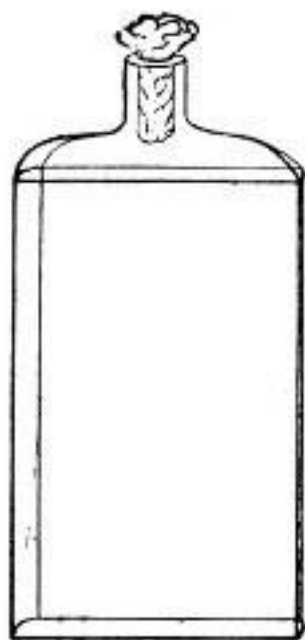


Рис. 5. Флакон для культивирования Ру.

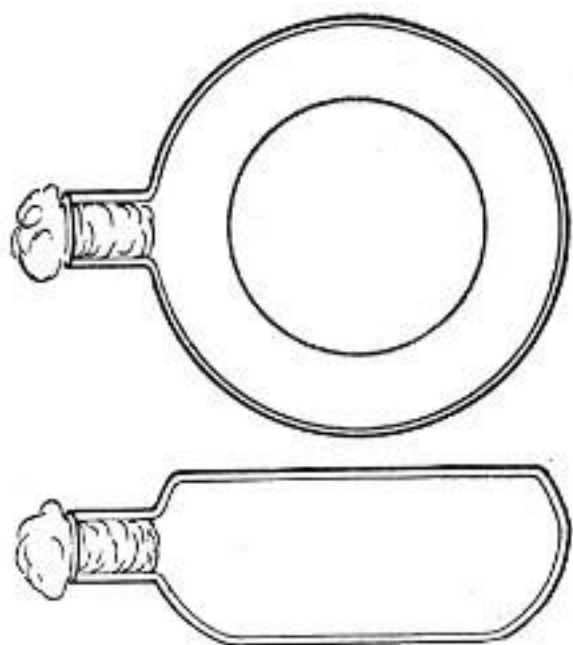


Рис. 6. флакон для культивирования гая.

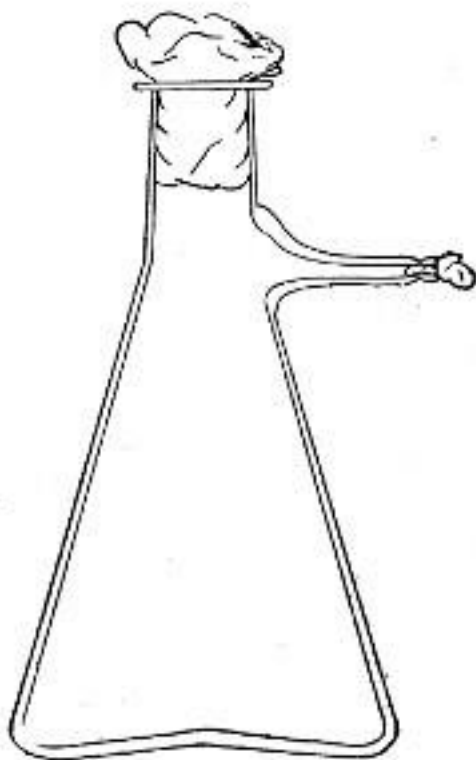


Рис. 7. Фильтровальная колба.

Еще более удобной является схема, используемая в лаборатории автора (рис. 6), поскольку благодаря большей глубине среды, которую можно получить в этих колбах, возможен чрезвычайно пышный рост; узкое горлышко сводит к минимуму вероятность случайного загрязнения, а общая форма позволяет ставить колбы одна на другую.

Фильтровальные колбы или колбы для сыворотки Kitasato (рис. 7).—Различных размеров, вместимостью от 250 до 2000 с.с. Они должны быть из прочного стекла, выдерживающего давление, которому они подвергаются, но в то же время должны быть тщательно отождены, чтобы выдерживать температуру, необходимую для стерилизации.

Все колбы должны быть либо из йенского стекла, либо из почти столь же известного стекла Resistance или R. Дополнительные первоначальные затраты оправдываются сравнительной устойчивостью стекла к поломке.

Чашки Петри или "Тарелки" (рис. 8, а).—Теперь они полностью заменили прямоугольные листы стекла, введенные компанией Koch для пластинчатого метода выращивания. Каждая "тарелка" состоит из пары круглых стеклянных дисков с резко загнутыми краями, образующих таким образом неглубокие тарелки, одна из которых немного большего диаметра, чем другая, и, таким образом, в перевернутом виде образующие крышку для тарелки меньшего размера. Наиболее часто используются тарелки с наружным диаметром 10 см и высотой 1,5 см. Партию из восемнадцати таких тарелок стерилизуют и хранят в цилиндрической медной коробке (30 см. высотой 12 см в диаметре) снабжен "откидной" крышкой. Внутри каждого ящика находится медное стремя с круглым дном, на которое опираются пластины и с помощью которого каждую из них можно по очереди поднимать к горловине ящика (рис. 9) для извлечения.

Капсулы (рис. 8, *b* и *c*).— Это чашки Петри меньшего диаметра, но большей глубины, чем те, что называются тарелками. Особенно полезными будут два размера, а именно: диаметр 4 см на 2 см в высоту, вместимость около 14 гр.; и диаметр 5 см на 2 см в высоту, вместимость около 25 гр. Они хранятся в медных цилиндрах, аналогичных тем, которые используются для изготовления тарелок, но размером 20 на 6 см и 20 на 7 см соответственно.

Градированные пипетки.—Требуется несколько их разновидностей, а именно:

1. Пипетки емкостью 1 куб.см, градуированные по 0,1 куб.см
2. Пипетки емкостью 1 куб.см, градуированные по 0,01 куб. см (рис. 10, *a*).

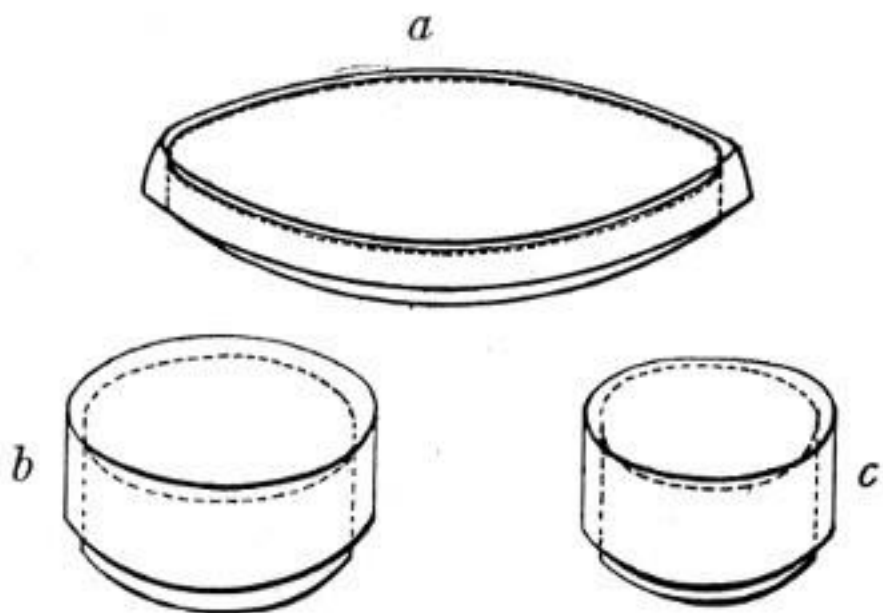


Рис. 8. Чашка Петри (*a*) и

капсулы (*b*, *c*).

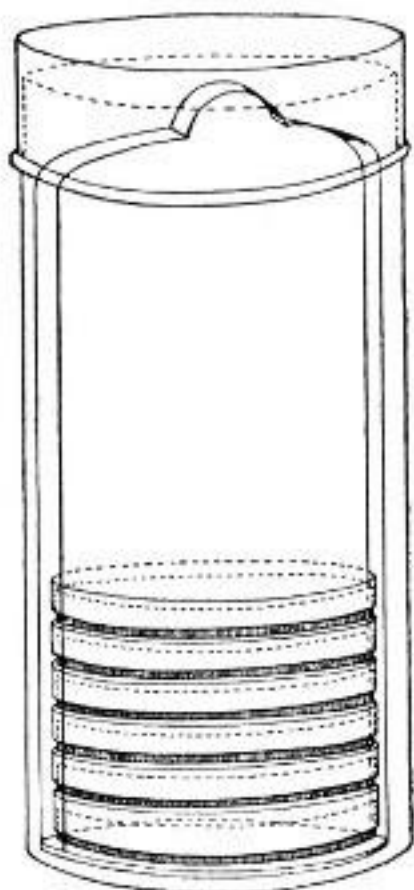


Рис. 9.Пластиновый ящик со стременем.

3. Пипетки емкостью 10 °с, градуированные через 0,1 °с (рис. 10, б).

Они должны быть около 30 см в длину (1 и 2 с довольно узким отверстием), градуированы до крайней точки и иметь свободное пространство длиной не менее 10 см между первой градуировкой и верхним концом; открытое горлышко должно быть заткнуто ватой. Каждый сорт следует стерилизовать и хранить в отдельном цилиндрическом медном футляре размером примерно 36 на 6 см с откидной крышкой, на которой простыми цифрами проставлена вместимость содержащихся в нем пипеток.



Рис. 10. Измерительные пипетки, а и б.

Лаборатория также должна быть обеспечена полным набором "Стандартных" градуированных пипеток, каждая пипетка в наборе должна иметь печать и сертификат, выданный одной из признанных лабораторий физических измерений, таких как Шарлоттенбург. Эти инструменты дороги и должны использоваться исключительно для стандартизации пипеток при обычном использовании и для калибровки небольших пипеток, изготовленных в лаборатории. Такой набор должен содержать, по меньшей мере, пипетки для подачи 10°с, 5°с, 2,5°с, 2°с, 1°с, 0,5°с, 0,25°с, 0,2°с, 0,1°с, 0,05 °с и 0,01°с соответственно.

Непосредственно в следующих разделах описаны небольшие стеклянные приборы, которые следует приготовить в лаборатории из стеклянных трубок различных размеров. Для их приготовления необходимы три предмета: сначала трехквдратный напильник из твердой стали или, предпочтительно, нож стеклодува из твердой тюрингенской стали для резки стеклянных трубок и т.д.; Затем пламя для паяльной трубки, поскольку, хотя многое можно сделать с помощью обычной горелки Бунзена, пламя для паяльной трубки обеспечивает быструю работу; и, наконец, горелка в виде крыльев летучей мыши.

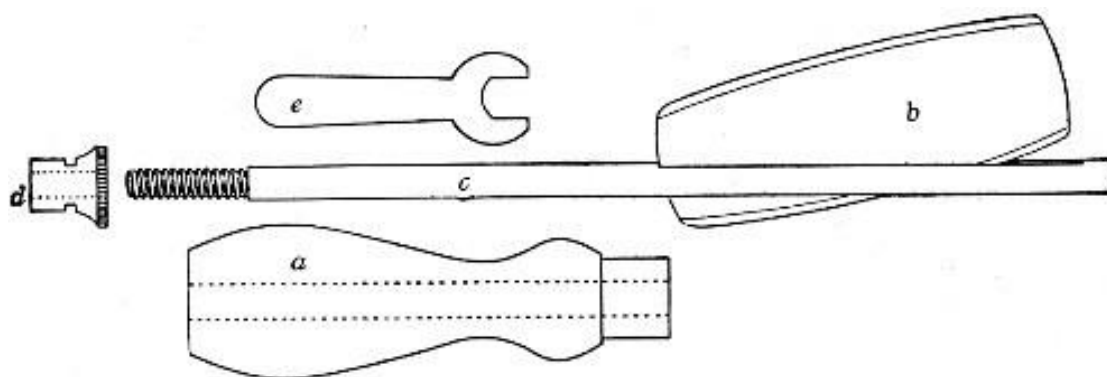


Рис. 11. Нож для резки стекла. а. рукоятка. б. обоюдоострое лезвие. с. стержень. d. стопорная гайка. е. гаечный ключ для гайки.

1. Нож для резки стекла. Это изделие продается в двух вариантах: настольный нож (рис. 11) и карманный нож. Первый снабжен лезвием длиной около 8 см с двумя режущими кромками. При рассмотрении в ярком свете видно, что режущая кромка состоит из мелких близко посаженных зубьев, похожих на те, что бывают у пилы. Нож должен оставаться острым благодаря частым заточкам на заточке из песчаника. Карманная форма, около 6 см в длину в целом, состоит из небольшого пружинящего лезвия с одной режущей кромкой, вмонтированной в чешую, как у обычного карманного ножа.

2. Для реального удобства работы паяльная трубка должна быть установлена на специальном столе, соединенном с цилиндрическим сильфоном, приводимым в действие педалью. Этот рисунок (рис. 12) выполнен путем установки столешницы из тикового дерева площадью 60 см на стойках закрытого сильфона гармошки двойного действия (Enfer's), снабженного универсальной газовой трубкой Fletcher's.

3. Обычная газовая горелка в виде крыльев летучей мыши, установленная в дальнем углу столешницы, незаменима при приготовлении трубчатых приборов с острыми изгибами и для покрытия недавно изготовленных стеклянных приборов слоем сажи, чтобы предотвратить слишком быстрое охлаждение и обычно связанный с ним результат - растрескивание.

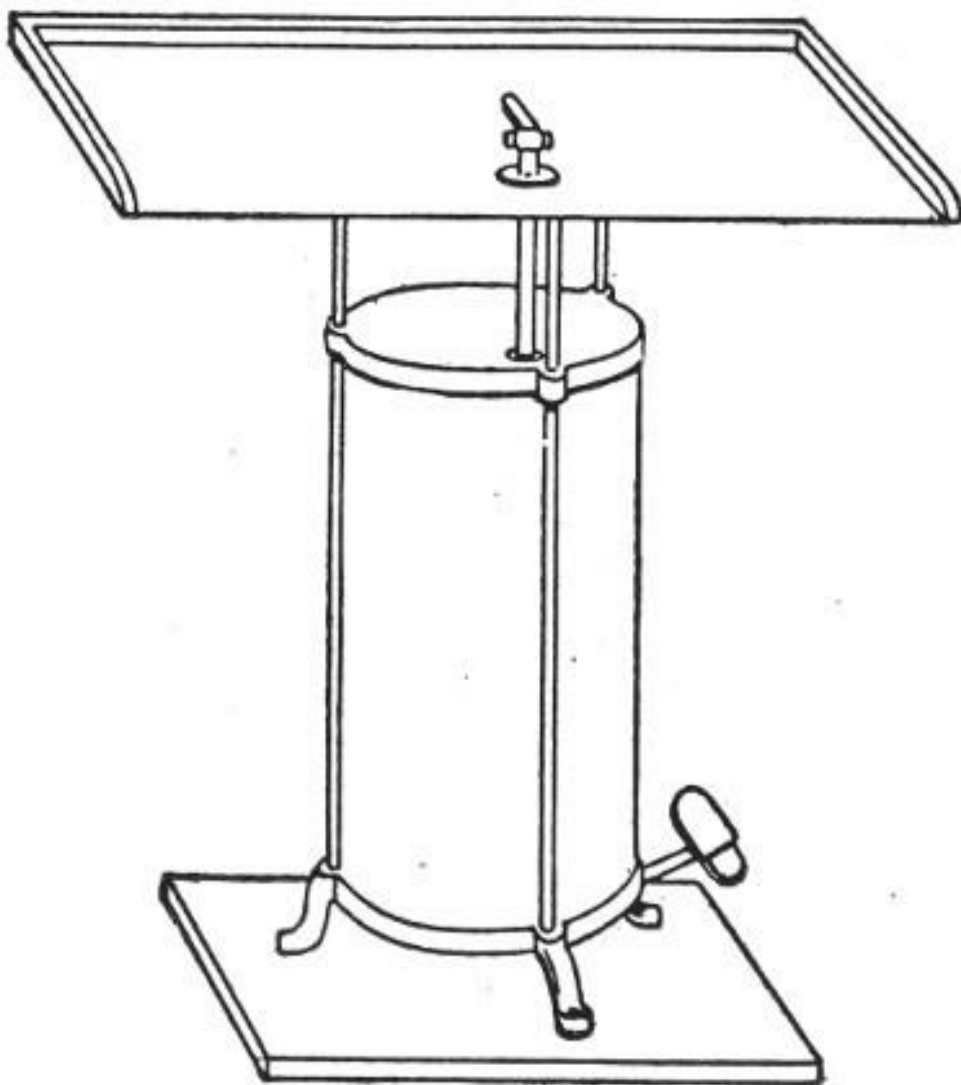


Рис. 12. Стол

стеклодува с ножным сильфоном Enfer.

6. Отстойные трубки $5 \times 0,5$ см, для реакций осаждения и т.д., А также для содержания небольших количеств жидкости, подлежащей центрифугированию в гематокрите. Их изготавливают, беря 14-сантиметровые отрезки толстых стеклянных трубок необходимого диаметра и нагревая середину в пламени Бунзена или паяльной трубки. Когда центральная часть станет достаточно мягкой, быстро разведите концы в стороны, а затем закруглите заостренные концы двух сформированных таким образом пробирок. С помощью стеклорезного ножа отрежьте все необходимое с открытых концов, чтобы получились трубочки необходимой длины.

Прямоугольный блок "пластилина" (пластилиновой глины), в который можно воткнуть конические концы, служит очень удобной подставкой для этих маленьких трубочек.

Капиллярные пипетки или пастеровские пипетки (рис. 13 а).— Эти маленькие инструменты бесценны, и их следует держать под рукой в достаточном количестве. Их готовят из трубок из мягкого стекла разного калибра (наиболее распространенный размер - 8 мм в диаметре)

следующим образом: держите стеклянную трубку длиной 10 см за каждый конец и, вращая ее, нагревайте центральную часть в пламени Бунзена или в пламени дутьевой трубки, пока стекло не раскалится докрасна и не станет мягким. Теперь снимите ее с огня и осторожно разведите концы в стороны, вытягивая нагретую часть в вместительную капиллярную трубку; разломите капиллярную часть в центре, запечатайте сломанные концы в пламени и закруглите края открытого конца каждой пипетки. Капиллярную пипетку дополняет незакрепленная ватная пробка, находящаяся в открытом рту. После приготовления определенного количества их стерилизуют и хранят партиями либо в металлических футлярах, аналогичных тем, которые используются для градуированных пипеток, либо в пробирках большого размера - запечатанными концами вниз и заглушенными по направлению к горловине футляра.

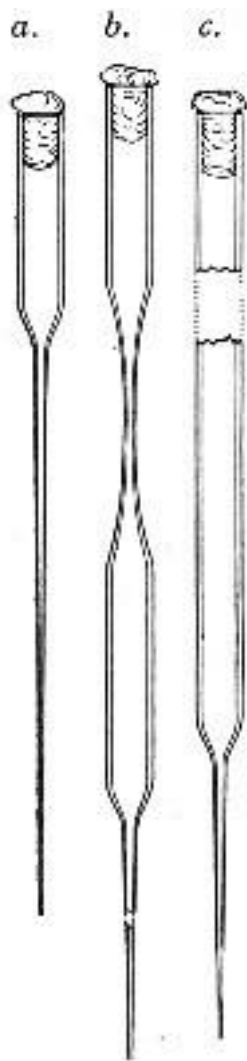


Рис. 13. Капиллярные пипетки. а, b, с.

Наполнение и опорожнение капиллярной пипетки наиболее удовлетворительно достигается путем надевания маленькой резиновой соски (аналогичной той, что есть на детской бутылочке для кормления, но *не перфорированной*) на верхний конец после обрезания или отщепления герметичного кончика капиллярной части. Если теперь надавить на эластичный баллон большим и указательным пальцами, пока конец капилляра находится ниже поверхности забираемой жидкости, часть содержащегося воздуха будет вытеснена, и последующее ослабление этого давления (приводящее к образованию частичного вакуума) заставит

жидкость подняться по капиллярной трубке. Последующее сжатие баллона, естественно, приведет к полному вытеснению жидкости из пипетки (рис. 14).

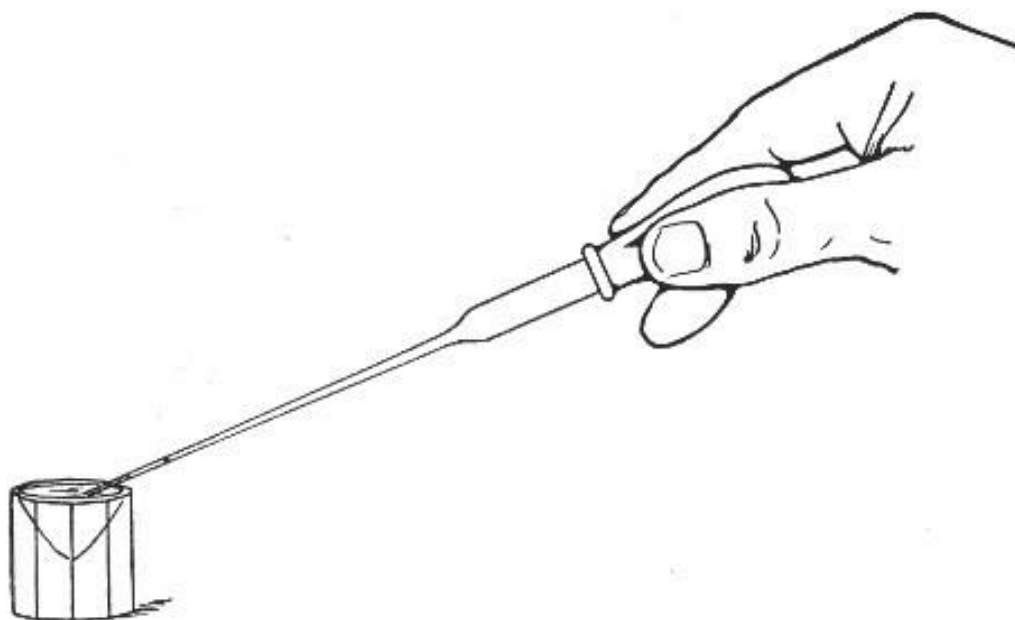


Рис.

14. Заполнение капиллярной соски—пипетки.

Модификация этой пипетки, в которой сужение или короткая длина капиллярной трубки вводится непосредственно под закупоренным горлышком (рис. 13, б), также будет чрезвычайно полезна при сборе и хранении патологических выделений.

Также будет полезна третья форма, в которой капиллярная часть имеет длину около 4-5 см и составляет лишь небольшую часть от всей длины пипетки (рис. 13, с).

"Кровяные" пипетки (рис. 15). —Также следует подготовить специальные пипетки для забора довольно больших количеств крови (как предлагает Пейкс). Они изготавливаются из *мягких* стеклянных трубок диаметром 1 см, аналогично пастеровским пипеткам, за исключением того, что необходимо использовать кончик пламени паяльной трубки, чтобы получить острые выступы на обоих концах центральной колбы. Концевые трубки должны иметь диаметр не менее 1 мм., чтобы избежать образования капилляров во время сбора жидкости.

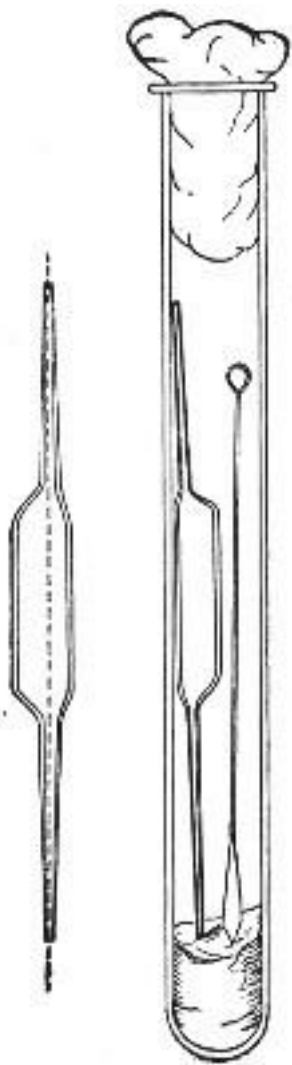


Рис. 15. Пипетки для взятия крови и закладка для волос в пробирке.



Рис. 16. Пипетка для взятия крови в металлическом корпусе термометра.

Для стерилизации и хранения каждую пипетку помещают в пробирку, кладут на комочек ваты и закупоривают пробирку обычным способом. Поскольку эти пробирки используются почти исключительно для анализа крови, обычно внутрь пробирки помещают булавку для заячьей губы с острым наконечником или плоскую иглу Хагедорна № 9, чтобы можно было простерилизовать все оборудование за один раз.

Для забора небольших количеств крови для реакций агглютинации и т.п. многие предпочитают короткий прямой отрезок узкой стеклянной трубки, вытянутой с обеих сторон почти до размеров капилляров. Такие пипетки, всего около 8 см в длину, удобнее всего стерилизовать в обычных металлических футлярах для термометров (рис. 16).

Градуированные капиллярные пипетки (рис. 17).—Они также должны быть изготовлены в лаборатории — из манометрической трубки — простой, удобной формы и отмерены с помощью "стандартных" пипеток (в сотых долях) для содержания таких количеств, как 10, 50 и 90 мм. рт. ст., и тщательно отмечены ромбиком для записи. Они, предварительно стерилизованные в больших пробирках, окажутся чрезвычайно полезными при приготовлении точных процентных растворов, когда доступны лишь незначительные количества жидкости.

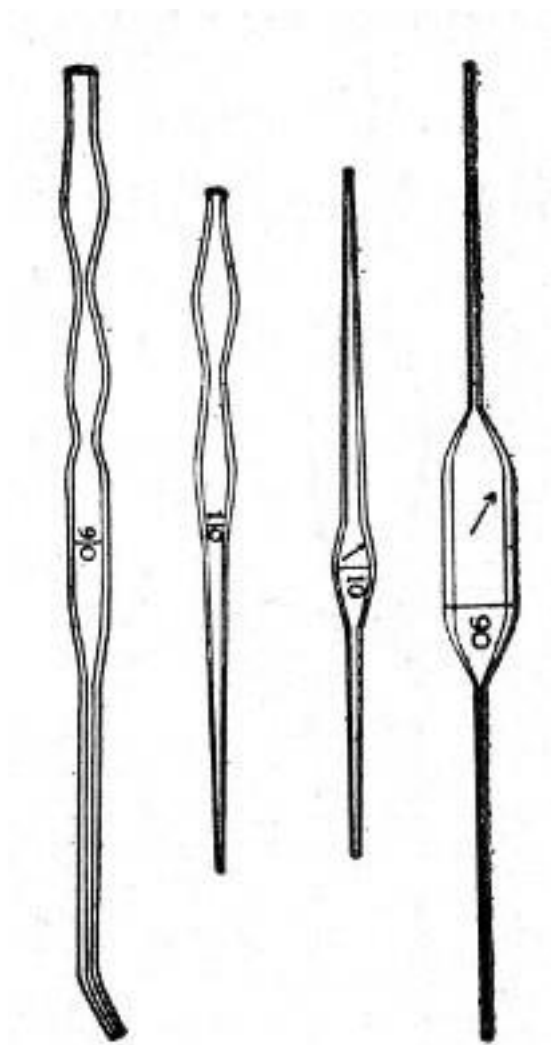


Рис. 17. Капиллярные градуированные пипетки.

Автоматический ("Дроссельный") Пипетки.—Эти оригинальные пипетки, представленные компанией Wright, могут быть легко откалиброваны в лаборатории и чрезвычайно полезны для градуировки небольших пипеток, для измерения небольших количеств жидкостей, при приготовлении разведений сыворотки для реакций агглютинации и т.д. Обычно их изготавливают из капиллярных пастеровских пипеток (рис. 13, а). Следующее описание изготовления пипетки диаметром 5 мм покажет, как калибруются маленькие автоматические пипетки.

1. Выберите пипетку, капиллярная часть которой имеет достаточно вместительное отверстие и обычные ровные стенки, и извлеките ватную пробку из открытого конца.
2. Нагрейте капиллярную часть около свободного конца в перепускном пламени горелки бунзена, вытяните ее в очень тонкую, похожую на волос, трубку и разломайте поперек. Этот волосоподобный кончик пропускает воздух, но он слишком тонкий, чтобы пропускать металлическую ртуть.
3. Из стандартной градуированной пипетки налейте 5 миллиметров чистой ртути в верхнюю широкую часть пипетки.

4. Присоедините резиновую соску к пипетке и, надавливая на колбу, постепенно направляйте ртуть непрерывным столбиком вниз по капилляру, пока она не упрется в нитевидный кончик.
5. Отрежьте капиллярную трубку точно на верхнем уровне ртутного столба, переверните ее и дайте ртути стечь.
6. Отсоедините оставшуюся часть капиллярной трубки от широкой верхней части пипетки, которая теперь предназначена для образования закрывающей трубки, или воздушной камеры, или того, что мы можем назвать "бочкой". Теперь у этого бочонка нижний конец имеет форму усеченного конуса, а верхний обрезан квадратно. Снимите соску.
7. Вставьте капиллярную трубку в этот цилиндр нитевидным концом вверх, а квадратно вырезанный конец выступает примерно на 0,5 см за сужающийся конец цилиндра.



Рис. 18. дроссельная пипетка—малая емкость.

8. Бросьте небольшой шарик сургуча в цилиндр сбоку от капиллярной трубки, а затем прогрейте трубку на газовой горелке до тех пор, пока воск не размягчится и не образует герметичное соединение между капиллярной трубкой и торцом цилиндра.
9. Прикрепите резиновую соску к открытому концу цилиндра и таким образом дополните пипетку, на которую можно положиться, чтобы всегда отсасывать и доставлять ровно 5 см. жидкости.

Небольшая модификация этой процедуры необходима при изготовлении пробирок для измерения объемов, превышающих, скажем, 75 мм. Таким образом, чтобы сделать дроссельную пипетку для измерения 100 мм рт. ст.:

1. Возьмите короткую игольчатую трубку и вытяните один конец в виде вместительного стержня капилляра, а другой конец вытяните в виде тонкого волоска, формируя таким образом маленькую пастеровскую пипетку с волоскоподобным концом капилляра.

2. С помощью стандартной пипетки заполните горлышко этой пипетки толщиной 100 мм. и сделайте царапину пишущим ромбом на верхнем уровне (a) ртутного мениска (рис. 19, А).

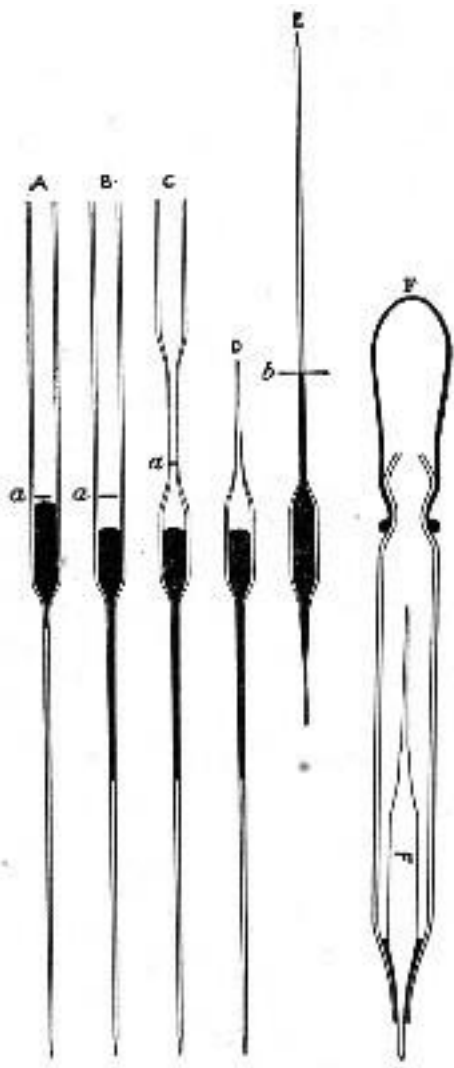


Рис. 19.Изготовление дроссельных пипеток большой

емкости

Теперь выдавите ртуть в стержень капилляра до упора, чтобы верхняя часть трубки в области алмазной царапины осталась пустой (рис. 19, Б).

3. Нагрейте трубку в области алмазной царапины в пламени паяльной трубки и, сняв трубку с пламени, вытяните ее так, чтобы алмазная царапина теперь занимала положение где-то около центра этого нового участка капилляра (рис. 19, В).

4. Нагрейте трубку в этом положении при слабом пламени горелки Бунзена и вытяните ее в виде кончика, похожего на волос. Отломите стеклянную трубку, оставив около 5 мм. волосовидного отростка, прикрепленного к верхней части капилляра (рис. 19, D). Дайте стеклу остыть.

5. Поднимите колбу за длинный стержень капилляра и дайте ртути вернуться в исходное положение — операция, которая будет облегчена путем отсоединения похожего на волос кончика от длинного отрезка капиллярной трубки.
6. Отметьте на стержне капилляра жирным карандашом положение конца ртутного столбика (рис. 19, E)
7. Подогрейте капиллярную трубку в этом месте при слабом свете горелки Бунзена и слегка вытяните ее, чтобы при разрезании в этом месте получился заостренный конец.
8. Ножом для резки стекла перережьте капиллярную трубку в точке "b" и дайте ртути стечь.
9. Теперь нанесите толстый слой сургуча на горлышко луковицы.
10. Возьмите стеклянную трубку с отверстием 5 мм и вытяните ее, как если бы вы делали обычную пастеровскую пипетку.
11. Отломите капиллярную часть так, чтобы осталась закрывающая трубка, аналогичная той, которая уже использовалась для градуированных пипеток меньшего размера. В эту закрывающую трубку опустите градуированную колбу и протяните стержень капилляра вниз через конический конец до тех пор, пока дальнейшее продвижение не будет остановлено слоем сургуча.
12. Нагрейте пипетку на газовой горелке, чтобы расплавился сургуч и образовалось герметичное соединение.
13. Наденьте резиновую соску на открытый конец покрывающей трубки, и автоматическая пипетка готова к использованию (рис. 19, F).

Пипетки для отстаивания (рис. 20).—Их готовят из узких стеклянных трубочек длиной 10 см, запечатывая один конец, выдувая маленькую лампочку в центре и затыкая открытый конец ватой; после стерилизации открытый конец снабжают коротким отрезком резиновой трубки и стеклянным мундштуком. Когда необходимо наблюдать реакции осаждения в очень небольших количествах жидкости, эти пробирки окажутся гораздо более удобными, чем упомянутые ранее пробирки размером 5 на 0,5 см.

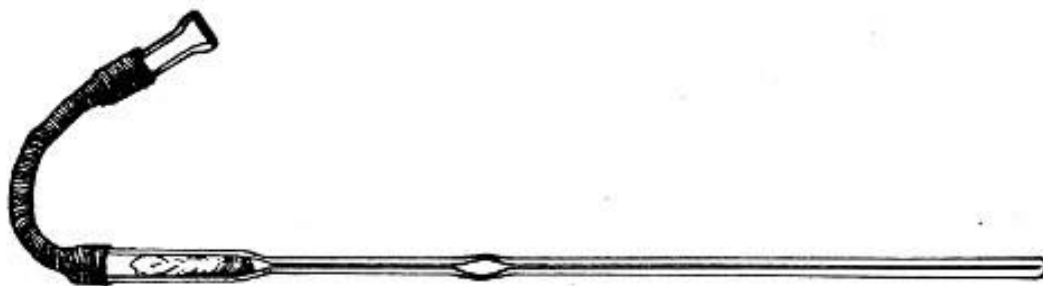


Рис. 20. Пипетка

для отстаивания.

Пастеровские пипетки, оснащенные сосками из индийской резины, также пригодятся для проведения тестов на осаждение, когда речь идет о незначительных количествах сыворотки и т.д.

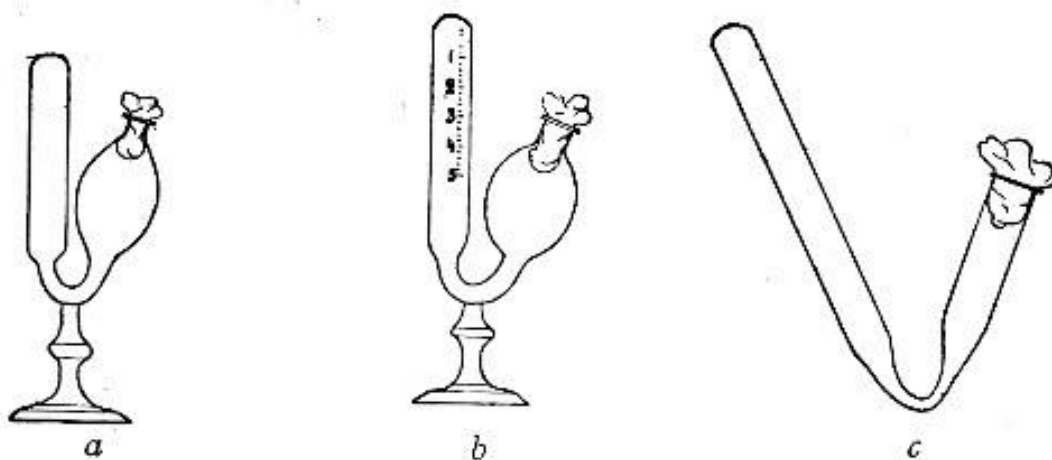


Рис. 21. Трубки для

брожения.

Трубки для брожения (рис. 21).—Они используются для сбора и анализа газов, выделяющихся из среды во время роста некоторых разновидностей бактерий, и могут быть как обычными (а), так и градуированными (b). Простую форму (рис. 21, c) можно изготовить из мягких стеклянных трубок длиной 14 см и диаметром 1,5 см. Пламя Бунзена прикладывают к месту примерно в 5 см. от одного конца такого отрезка трубки, и трубка слегка вытягивается, образуя сужение, сжатая часть сгибается в пламени в виде крыла летучей мыши под острым углом, а открытый конец длинной руки закрывается в пламени паяльной трубки. Открытый конец короткого рукава закругляется, а затем затыкается ватой, и пробирка готова к стерилизации.

ЧИСТКА СТЕКЛЯННЫХ ПРИБОРОВ.

Вся стеклянная посуда, используемая в бактериологической лаборатории, должна быть тщательно вымыта перед использованием, и это правило одинаково применимо как к новому, так и к старому оборудованию, хотя используемые методы могут незначительно отличаться.

Для очистки новых пробирок.-

1. Поместите тюбики в ведро или другую удобную емкость, залейте водой и добавьте горсть "Сапона" или другого мыльного порошка. Убедитесь, что пробирки заполнены и погружены в воду.
2. Поставьте ведро на сильный огонь Бунзена и кипятите в течение тридцати минут — или кипятите в автоклаве в течение аналогичного периода.
3. Очистите внутреннюю поверхность пробирок с помощью щеток для пробирок и тщательно промойте в холодной воде.
4. Переверните пробирки и дайте им полностью стечь.
5. Высушите тюбики и отполируйте стекло изнутри и снаружи мягкой тканью, такой как selvyt.

Новые колбы, пластины и капсулы необходимо чистить аналогичным образом.

Для очистки новых градуированных пипеток.—

1. Поместите пипетки в удобную емкость, наполненную водой, в которую был добавлен мыльный порошок.
2. Энергично кипятите воду в течение двадцати минут на огне Бунзена.
3. Промойте пипетки в проточной воде и слейте воду.
4. Пропустите дистиллированную воду через пипетки и слейте.
5. Пропустите спирт-ректификат через пипетку и слейте как можно больше жидкости.
6. Поместите пипетки в духовку с подачей горячего воздуха (*видео*, стр. 31), закройте дверцу, откройте вентиляционную заслонку и медленно увеличьте температуру примерно до 80 ° C. Выключите газ и дайте духовке остыть.

Или 6а. Подсоедините каждую пипетку по очереди к резиновой трубке ножного сильфона или продувочной трубке и продувайте воздух через пипетку до тех пор, пока внутренняя поверхность не станет сухой.

Посуда, которая уже использовалась, считается *зараженной*, и с ней обращаются несколько иначе.

Зараженные пробирки.-

1. Уложите пробирки в проволочную корзину автоклава (предварительно удалив ватные пробки, колпачки и т.д.) в вертикальном положении и перед заменой корзины убедитесь, что на дне котла достаточно воды. Теперь прикрепите кусок резиновой трубки к ближайшему водопроводному крану и с помощью этого наполните каждую трубку водой.

2. Полностью продезинфицируйте, подвергнув пробирки и т.п. Воздействию температуры 120 ° C в течение двадцати минут (*видео*, стр. 37).

(Если автоклава нет, пробирки необходимо поместить в варочный котел или даже в большую кастрюлю или ведро с плотно закрывающейся крышкой и интенсивно прокипятить в течение примерно тридцати-сорока пяти минут для обеспечения дезинфекции.)

3. Пока пробирка еще горячая, опорожните ее по очереди и аккуратно очистите ее внутреннюю поверхность жесткой щеткой для пробирок.

4. Поместите тубики в ведро или другую удобную емкость, залейте водой и добавьте горсть мыльного раствора или другого мыльного порошка. Убедитесь, что пробирки заполнены и погружены в воду.

5. Поставьте ведро на большой огонь Бунзена и кипятите в течение тридцати минут.

6. Очистите внутреннюю поверхность пробирок с помощью щеток для пробирок и тщательно промойте в холодной воде.

7. Слейте воду и опустите тубики в большую банку с водой, подкисленной 2-5% соляной кислотой. Оставьте их там примерно на пятнадцать минут.

8. Достаньте из банки с кислотой, слейте воду, тщательно промойте в проточной воде, затем дистиллированной.

9. Переверните пробирки и дайте им полностью стечь.

Высушите тьюбики и отполируйте стекло изнутри и снаружи мягкой тканью, такой как selvyt.

Инфицированные колбы, пластины и капсулы необходимо обрабатывать аналогичным образом.

Колбы, которые использовались только для приготовления питательной среды, должны быть очищены сразу же по окончании работы. Наполните каждую колбу водой, в которую было добавлено немного мыльного порошка и несколько кристаллов перманганата калия, и дайте закипеть на открытом огне. После этого внутреннюю поверхность колбы обычно можно идеально очистить с помощью щетки для колб, но в некоторых случаях воду подкисляют 5%-ным раствором азотной кислоты или большой комок влажной ваты, предварительно обваленный в серебряном песке, необходимо встряхнуть внутри колбы, после чего тщательно промыть чистой водой, высушить и отполировать.

Инфицированные пипетки.—

1. Сразу после использования погрузите зараженные пипетки в высокие стеклянные цилиндры, содержащие 2-процентный раствор лизола, и оставьте их там на несколько дней.

2. Достаньте из банки и слейте воду. Прокипятите в воде, в которую добавлено немного мыла, в течение тридцати минут.

3. Тщательно промойте в холодной воде.

4. Погрузите в 5-процентную азотную кислоту на час или два.

5. Еще раз промойте под проточной водой, чтобы удалить все следы кислоты.

6. Завершите очистку, как описано в разделе "новые пипетки".

При работе с градуированными капиллярными пипетками, используемыми для взятия крови или сыворотки (как новой, так и инфицированной), различные этапы, начиная с 5, занимают много времени, и процесс очистки можно существенно ускорить, если использовать следующее устройство.

Установите крупногабаритную фильтровальную колбу Kitasato на всасывающий насос Sprengel's или воздушный насос Geryk (см. стр. 43). К боковой трубке фильтровальной колбы прикрепите резиновую напорную трубку длиной 20 см, калибр которой достаточно велик, чтобы в нее помещались концы пипеток.

Затем наполните небольшой стакан дистиллированной водой. Присоедините первую пипетку к свободному концу резиновой трубки, поместите пипетку острием вниз в стакан с водой и запустите насос (рис. 22).

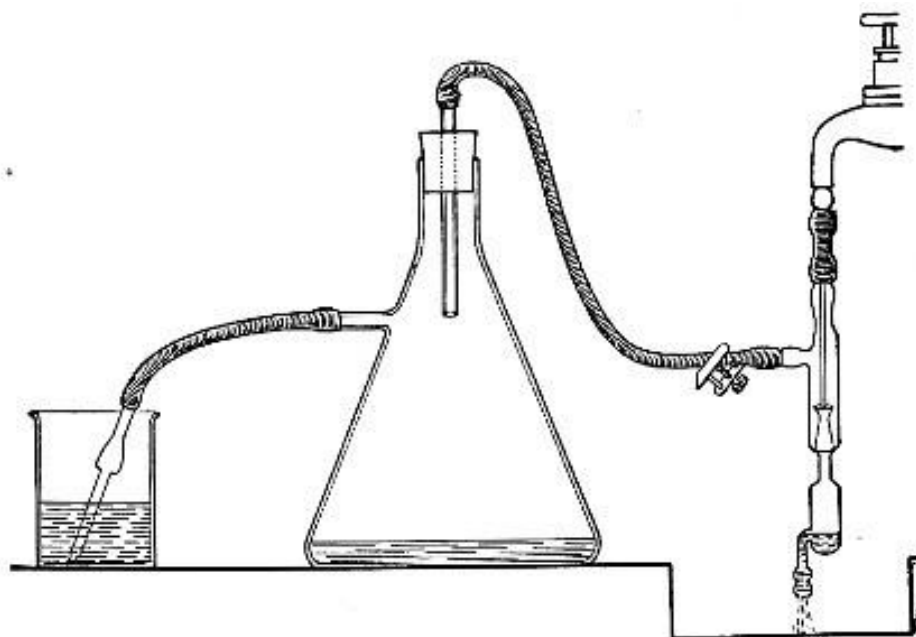


Рис. 22.Пипетки

для очистки крови.

Когда вся вода будет откачана через пипетку в фильтровальную колбу, наполните мензурку спиртом-ректификатом, а когда он закончится, снова добавьте эфир. Отсоедините пипетку и высушите в духовке с горячим воздухом.

Слайды и обложки (рис. 23) при первой покупке имеют "жирную" поверхность, на которой вода собирается мельчайшими каплями и эффективно предотвращает растекание тонких ровных пленок.

Предметные стекла для микроскопии.—Обычно используются слайды, известные как слайды "три на один" (размером 3 на 1 дюйм или 76 на 26 мм), и они должны быть из хорошего белого стекла с отшлифованными краями.

Новым предметным стеклам следует дать постоять в 5-процентном спирте, подкисленном. выдерживают соляную кислоту в течение нескольких часов, промывают в проточной воде, вытирают полотенцем, высушивают и, наконец, протирают тканью selvyt.

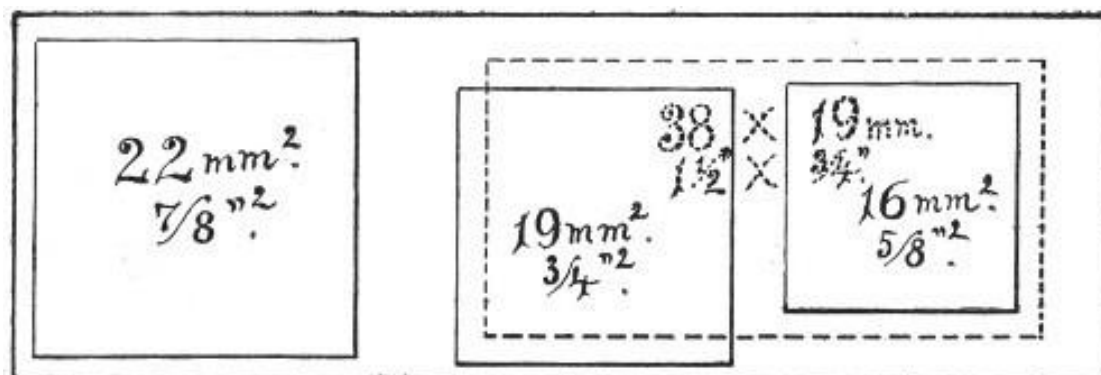


Рис. 23.Слайды и

обложки в натуральную величину.

Если для немедленного использования требуется всего несколько слайдов, рекомендуется потереть поверхность ювелирной наждачной бумагой (Hubert's 00). Кусок твердой древесины 76 × 26 × 26 мм. с куском этой наждачной бумаги, плотно обмотанным клеем, это чрезвычайно полезный предмет на столе для микроскопа.

Покровные листы.—Наиболее подходящие размеры - квадраты размером 19 мм для обычных заготовок пленки для покровного стекла и 38 на 19 мм. прямоугольники для пленок крови и серийных срезов; обе разновидности должны иметь толщину "№ 1", которая варьируется от 0,15 до 0,22 мм., чтобы их можно было использовать с иммерсионными линзами высокой мощности.

Покровные листы следует чистить следующим образом:

1. Опустите покровные листы один за другим в эмалированную железную кастрюлю или высокий стеклянный стакан, содержащий 10-процентный раствор хромовой кислоты.
2. Разогрейте на огне Бунзена и дайте кислоте слегка прокипеть в течение двадцати минут.

Примечание.—В мензурку можно положить несколько кусочков трубочной глины или пемзы, чтобы предотвратить "разбрызгивание" хромовой кислоты.

3. Выложите салфетки в плоскую стеклянную посуду и промойте в проточной воде под краном, пока не исчезнут все следы желтого цвета. Во время мытья следите за тем, чтобы накладки находились в движении, придавая посуде вращательное движение.

4. Промойте дистиллированной водой аналогичным образом.

5. Промойте спиртом-ректификантом.

6. Перенесите покровные листы с помощью чистых щипцов, предварительно нагретых на огне Бунзена для удаления следов жира, в небольшой стакан с абсолютным спиртом.

Слейте спирт и перенесите покровные листы с помощью пинцетов в стеклянную банку с широким горлышком, содержащую абсолютный спирт, в которой они будут храниться, и плотно закройте.

Примечание.—После однократного помещения в хромовую кислоту к покровным листам ни в коем случае нельзя прикасаться пальцами.

Использованные слайды и титульные листы.—Использованные слайды с установленными защитными накладками и защитные накладки, используемые для подвесных креплений, при выбрасывании следует выбрасывать в емкость с 2-процентным содержанием. раствор лизола.

После погружения в него на неделю или около того даже накладки, покрытые канадским бальзамом, можно легко отсоединить от них.

Слайды.—

1. Тщательно промойте предметные стекла в проточной воде.
2. Отварите горки в воде, в которую был добавлен "сапон", в течение получаса.
3. Тщательно промойте в холодной воде.

4. Высушите и отполируйте сухой тканью.

Обложки. -

1. Тщательно промойте покровные листы в проточной воде.
2. Прокипятите покровные листы в 10-процентном. растворе хромовой кислоты, как для новых покровных листов.
3. Тщательно промойте под проточной водой.
4. Выберите те покровные листы, на которых заметно много прилипшей грязи, и разотрите их между большим и указательным пальцами под краном с водой. Грязь обычно легко стирается, так как она стала рыхлой от контакта с хромовой кислотой.
5. Верните все покровные листы в мензурку, залейте свежим раствором хромовой кислоты и обработайте как новые покровные листы.

Примечание.—*Пробирки, пластины, капсулы* т.д., которые в результате длительного использования поцарапались и помутнели или которые невозможно очистить каким-либо другим способом, можно почистить, погрузив их в эмалированную чугунную ванну с водой, подкисленной до 1%. с плавиковой кислотой в течение десяти минут, тщательно промыть в воде, высушить и отполировать.

ЗАКУПОРИВАНИЕ ПРОБИРОК И КОЛБ.

Перед стерилизацией все пробирки и колбы должны быть тщательно закупорены ватой, и для этой цели следует использовать самую лучшую впитывающую вату (предпочтительно ту, которая упакована в цилиндрические однофунтовые пакеты и проклеена папиросной бумагой, известной как хирургическая вата).

1. Для пробирки или небольшой колбы оторвите от рулона полоску ваты примерно 10 см длиной и 2 см шириной.
2. Аккуратно заверните концы и слегка раскатайте полоску шерсти между большим и указательным пальцами обеих рук, чтобы получился длинный цилиндр.
3. Сложите вдвое в центре и вставьте закругленный конец в открытое горлышко тюбика или колбы.
4. Теперь, удерживая вату между большим и указательным пальцами правой руки, вращайте пробирку между пальцами левой руки и постепенно ввинчивайте в ее горловину пробку из ваты на расстояние примерно 2,5 см, оставляя примерно такую же длину выступающей ваты.

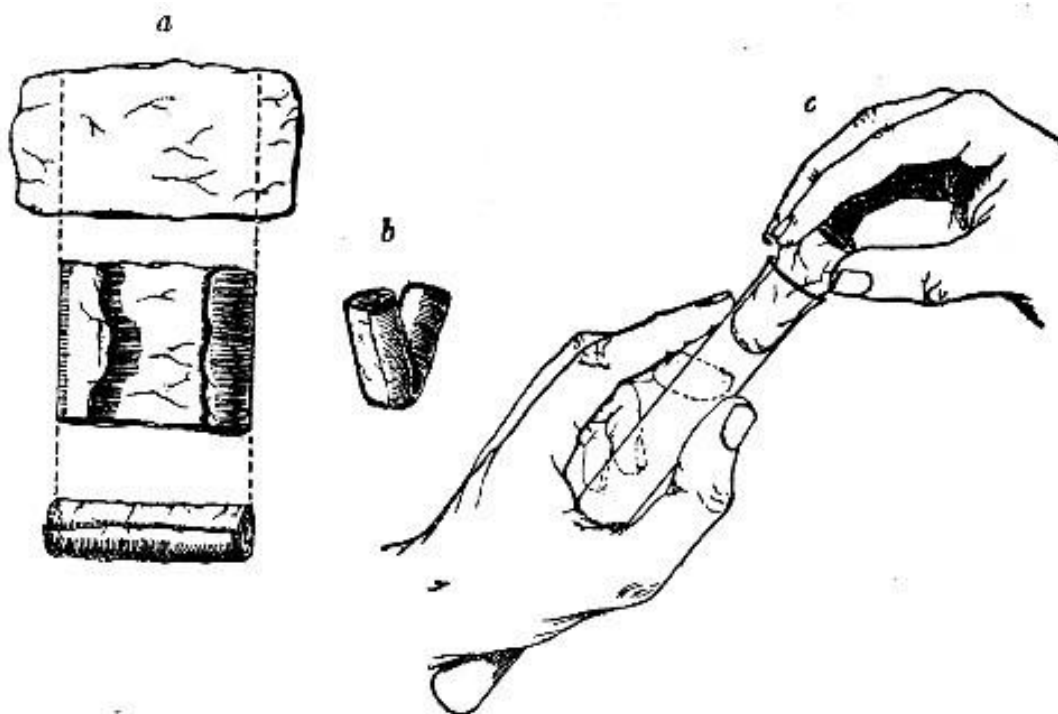


Рис.

24. Закупоривание пробирок: а, свернутый шерстяной цилиндр; б, сложенный вдвое шерстяной цилиндр; в, вставленный в пробирку шерстяной цилиндр.

Пробка должна быть прочной и достаточно плотно прилегать к пробирке или колбе, фактически достаточно плотно, чтобы выдержать вес стакана плюс количество среды, которое должен содержать сосуд, но не настолько плотно, чтобы ее можно было легко извлечь заворачивающим движением при захвате четвертым или третьим и четвертым пальцами и ладонью.

Для большой колбы необходимо взять аналогичную, но более крупную полоску ваты; способ изготовления и установки пробки идентичен.

III. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ.

СТЕРИЛИЗУЮЩИЕ СРЕДСТВА.

Стерилизация — *то есть* удаление или уничтожение зародышевой жизни — может быть осуществлена с помощью различных средств. Применительно к практическим требованиям бактериологической лаборатории многие из этих средств, такие как электричество, солнечный свет и т.д., не имеют большой ценности, другие ограничены в своем применении; третьи, опять же, настолько хорошо подходят для определенных целей, что их использование почти полностью ограничено ими.

Обычно используются следующие стерилизующие средства:

Химические реактивы. — *Дезинфицирующие средства* (для дезинфекции стеклянных и металлических приборов и пораженных тканей).

Физические агенты. Тепло.—(а) *Сухое тепло*:

1. Открытый огонь (для стерилизации платиновых игл и т.д.).
2. Муфельная печь (для стерилизации фильтрующих свечей и разрушения пораженных тканей).
3. Горячий воздух (для стерилизации всей стеклянной посуды и металлических приборов).

(b) *Влажное тепло*:

1. Вода при температуре 56°C (для стерилизации некоторых белковых жидкостей).
2. Вода при температуре 100°C (для стерилизации хирургических инструментов, резиновых трубок, пробок и т.д.).
3. Подача пара при температуре 100°C (для стерилизации сред).
4. Перегретый пар при температуре 115°C или 120°C (для дезинфекции загрязненных изделий и уничтожения старых форм размножения бактерий).

Фильтрация.—

1. Фильтры из ваты (для стерилизации воздуха и газов).
2. Фарфоровые фильтры (для стерилизации различных жидкостей).

СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ.

Химические реагенты, относящиеся к классу, известному как антисептики (*т.е.* Вещества, которые подавляют рост, но не уничтожают жизнедеятельность бактерий), очевидно, бесполезны. Дезинфицирующие средства или бактерициды (*т.е.* Вещества, уничтожающие жизнедеятельность бактерий), с другой стороны, полезны при дезинфекции болезнетворного материала, а также различных частей оборудования, таких как пипетки, до их очистки и полной стерилизации другими способами. К этому классу (в порядке общей полезности) относятся:

Лизол, 2%. раствор;

Перхлорид ртути, 0,1%. раствор;

Карболовая кислота, 5%. раствор;

Абсолютный спирт;

Эфир;

Хлороформ;

Камфора;

Тимол;

Толуол;

Эфирные масла, такие как горчичное масло, чесночное масло.

Формальдегид является мощным бактерицидным средством, но проникающие пары ограничивают его применение. Эти дезинфицирующие средства мало используются при окончательной стерилизации оборудования, главным образом из-за сложности их полного удаления, поскольку присутствия даже следов этих химических веществ достаточно для того,

чтобы настолько подавить или изменить рост бактерий, чтобы свести на нет последующие эксперименты, проводимые с помощью оборудования, стерилизованного таким образом.

Примечание.—Пробирки, колбы, фильтровальные колбы, пипетки, стеклянные трубки и т.д. В экстренных случаях можно быстро стерилизовать, промывая поочередно дистиллированной водой, раствором перхлорида ртути, спиртом и эфиром, сливая воду и, наконец, осторожно нагревая над газовым пламенем для полного удаления паров эфира. Хлороформ или другие летучие дезинфицирующие средства могут быть добавлены в различные жидкости для уничтожения содержащихся в них бактерий, и когда это будет сделано, они могут быть полностью удалены из жидкости легким нагреванием.

Сухой жар.— *Открытое пламя* горелки Бунзена неизменно используется для стерилизации платиновых игл (которые нагреваются до красноты) и может использоваться для стерилизации наконечников пинцетов или других небольших инструментов, защитных стекол, пипеток и т.д., при этом достаточно очень короткого воздействия этого тепла.

Эфирное пламя.—В экстренных случаях небольшие инструменты, иглы и т.д. можно стерилизовать, окунув их в эфир и после извлечения подожгите прилипшую жидкость, чтобы она выжгла поверхность инструментов. Повторите процесс дважды. Тогда можно с уверенностью предположить, что обработанный таким образом аппарат стерилен.

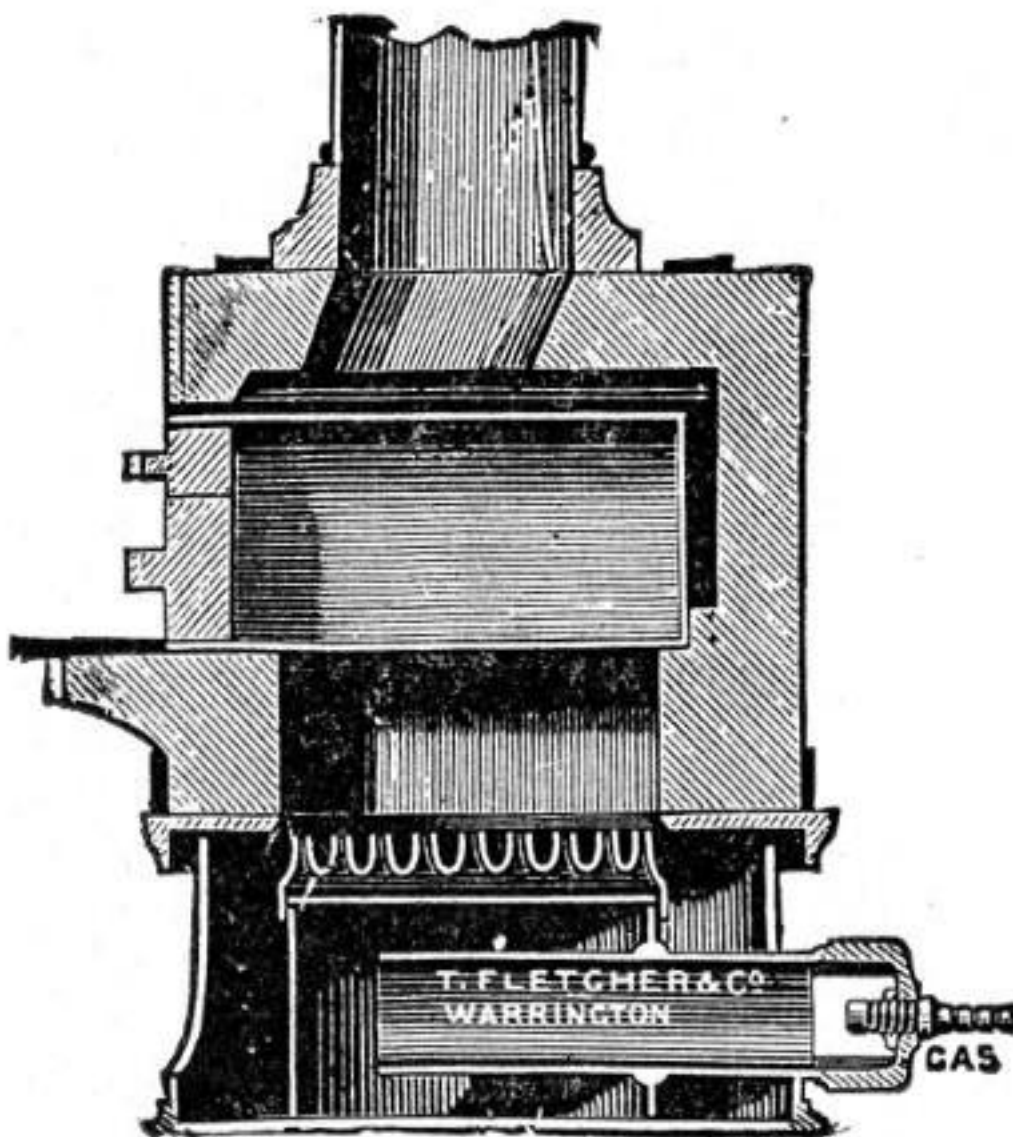


Рис. 25.Муфельная

печь.

Муфельная печь (рис. 25).—Хотя этот вид тепла в основном используется для уничтожения трупов мелких инфицированных животных, патологических тканей и т.д., Он также используется для стерилизации фарфоровых фильтрующих свечей (вид стр. 42).

Фильтрующие свечи дезинфицируют сразу после использования кипячением в мензурке с водой в течение пятнадцати-двадцати минут. Однако при такой обработке мертвые тела бактерий остаются на поверхности и закупоривают щели фильтра.

Для удаления органических веществ и подготовки фильтрующей свечи к дальнейшему использованию выполните следующие действия:

1. Заверните каждый буж в кусок асбестовой ткани, закрепите концы ткани несколькими витками медной проволоки и поместите внутрь муфеля (небольшой муфель размером 76 × 88 × 163 мм вмещает, возможно, четыре маленькие фильтрующие свечи).

2. Зажгите газ и доведите содержимое муфеля до белого каления; поддерживайте эту температуру в течение пяти минут.

3. Погасите газ, а когда муфель достаточно остынет, извлеките фильтрующие свечи и храните их (не снимая асбестовой обертки) в стерильных металлических коробках.

Примечание.—Слишком быстрое охлаждение свечей, например, при извлечении их из муфеля до того, как он остынет до комнатной температуры, может привести к образованию микроскопических трещин и дефектов, которые фактически снизят их эффективность.

Горячий воздух.—Горячий воздух при температуре 150 ° C. Уничтожает все бактерии, споры и т.д. Примерно за тридцать минут; кратковременное воздействие температуры от 175 ° до 180 ° C. дает тот же результат и предлагает более удобный метод стерилизации. Этот метод применим только к стеклу и металлическим веществам, а также к небольшому количеству ваты, содержащейся в пробирках и т.д. Большие массы ткани неэффективно стерилизуются сухим нагревом — за исключением обугливания, — поскольку его проникающая способность невелика.

Стерилизация горячим воздухом производится в воздушнонагревательной печи (рис. 18). Это прямоугольная металлическая коробка с двойными стенками, установленная на подставке и нагреваемая снизу большой горелкой Бунзена. Внутренняя часть печи снабжена съемными полками, на которых размещаются изделия, подлежащие стерилизации, либо поодиночке, либо упакованные в квадратные проволочные корзины или ящики, хранящиеся специально для этой цели. Одна из сторон откидывается на петлях, образуя дверь. Центральная часть металлического днища, на котором играло бы пламя Бунзена, срезана и заменена пластинами из огнеупорного кирпича, которые скользят по металлическим пазам и легко заменяются при поломке или износе. Верхняя часть духовки снабжена перфорированной заслонкой для вентиляции и двумя трубками, одна из которых предназначена для установки столбчатого термометра с градуировкой на 200 ° или 250 ° C. Другая предназначена для терморегулятора. Можно использовать обычный ртутный терморегулятор, но предпочтительнее использовать регулируемую капсулу типа Hearson (см. стр. 219) с пружинным рычагом, прикрепленным к рычагу таким образом, чтобы при достижении температуры кипения капсулы (*например*, 175 °C) подача газа полностью прекращалась и струю нельзя было снова зажечь, пока пружинный рычаг не будет отрегулирован вручную. Терморегулятор ни в коем случае не является необходимостью и может быть заменен термометром с большим отверстием и скользящим платиновым наконечником, соединенным с электрическим звонком, который можно легко настроить так, чтобы он звонил при любой заданной температуре. Даже если стерилизатор оснащен описанным выше капсульным регулятором, контактный термометр также должен быть установлен.

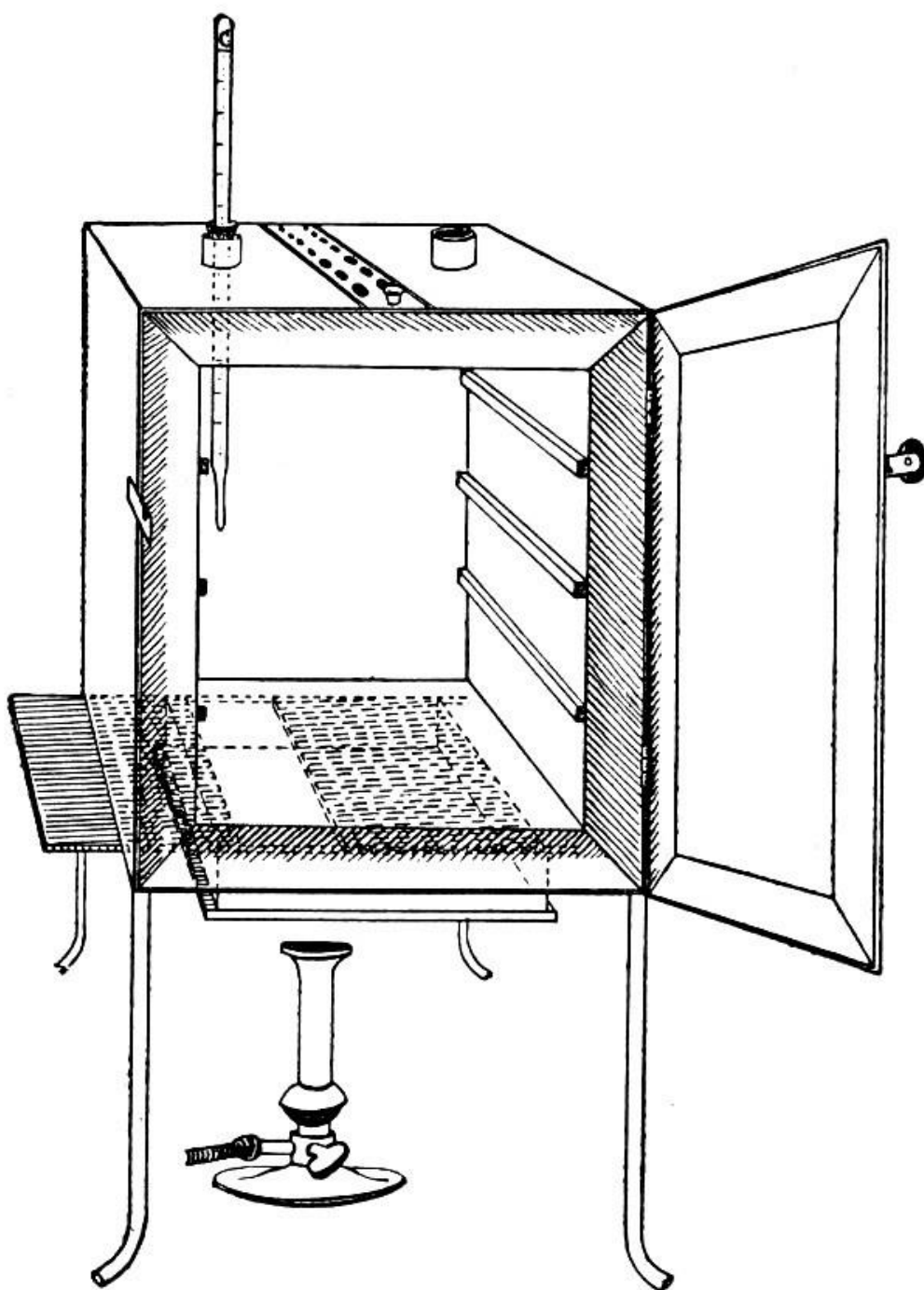


Рис. 26. Воздушная

печь.

Для использования духового шкафа с горячим воздухом.-

1. Поместите ящики с пробирками, металлические футляры с пластинами и пипетками, незакрепленные приборы и т.д. Внутри печи, особенно следя за тем, чтобы ни одна из ватных пробок не соприкасалась со стенками, иначе тепло, передаваемое металлом, приведет к их обугливанию или даже воспламенению.

Чтобы приготовить проволочный ящик для размещения пробирок и т.д., покройте дно слоем толстой асбестовой ткани; или возьмите немного асбестового волокна, смочите его небольшим количеством воды и разомните в пасту; нанесите пасту на дно ящика, распределив ее по ячейкам и разровняв поверхность пестиком. Когда несколько ящиков будут обработаны таким образом, поместите их в духовку с горячим воздухом, закройте дверцу, откройте вентиляционную заслонку, включите газ и доведите температуру внутри примерно до 160 ° C. Через десятиминутный интервал выключите газ, откройте дверцу духовки и дайте содержимому остыть. Теперь асбест образует гладкий, сухой, губчатый слой на дне, который прослужит много месяцев, прежде чем потребует замены, и значительно уменьшит потери труб в результате поломки.

Медные цилиндры и большие пробирки, предназначенные для приема пипеток, изготавливаются аналогичным образом, чтобы защитить кончики этих изделий от повреждений.

2. Закройте дверцу духовки и откройте вентиляционную заслонку, чтобы влага, оставшаяся в трубках и т.д., могла выйти наружу; зажгите газ внизу; включите электрическую сигнализацию на 100 ° C.

3. Когда температура в духовке достигнет 100°C. Закройте заслонку вентиляции; установите аварийный сигнал на 175°C.

4. Увеличьте температуру до 175 ° C.

5. Немедленно погасите газ и дайте прибору остыть.

6. Когда температура внутри, указываемая термометром, упадет до 60°C —но не раньше, — дверцу можно открыть, вынуть стерильные изделия и убрать их на хранение.

Примечание.—Несоблюдение этой меры предосторожности при охлаждении духовки до 60 ° C приведет к появлению многочисленных трещин и переломов трубок.

При извлечении из духовки ватные пробки, вероятно, станут слегка коричневого цвета.

Металлические инструменты, такие как ножи, ножницы и щипцы, можно стерилизовать в печи с горячим воздухом, как описано выше, но воздействие температуры 175 ° C, вероятно, серьезно повлияет на температуру стали и, безусловно, затупит режущие кромки. Однако, если требуется стерилизовать хирургические инструменты горячим воздухом, их следует упаковать в металлическую коробку или коробочки, нагреть до 130 ° C и оставить при этой температуре примерно на тридцать минут.

Влажное тепло.—*Вода при температуре 56°C.*—Эта температура, если ее поддерживать в течение тридцати минут, достаточна для уничтожения вегетативных форм бактерий, но практически не влияет на споры. Его применение ограничено стерилизацией таких белковых "текучих" сред, которые могли бы коагулировать при более высокой температуре.

Способ.—

1. Установите водяную баню, нагреваемую пламенем Бунзена, которое регулируется терморегулятором, так, чтобы температура воды оставалась на уровне 56 ° С.
2. Погрузите пробирки или колбы с белковой жидкостью на водяную баню так, чтобы верхний уровень такой жидкости был по крайней мере на 2 см ниже уровня воды. (Температура ванны сейчас несколько понизится, но через несколько минут снова поднимется до 56°C).
3. После тридцатиминутного воздействия температуры 56°C погасите газ, достаньте пробирки или колбы из ванны и опустите в проточную воду, чтобы их содержимое быстро остыло.
4. После уничтожения вегетативных форм бактерий, присутствующих в жидкости, выдержите ее в течение двадцати четырех часов в прохладном, темном месте; по истечении этого времени по крайней мере некоторые из тех спор, которые могут присутствовать, прорастут и примут вегетативную форму.
5. Уничтожьте эти новые вегетативные формы аналогичным воздействием температуры 56 ° С на второй день, в то время как другие, с более медленным прорастанием, могут быть обнаружены на третий день и так далее.
6. Для обеспечения тщательной стерилизации повторяйте процедуру каждый из шести последующих дней.

Этот метод выдерживания жидкостей на водяной бане при температуре 56 ° С в течение получаса в течение каждого из шести последующих дней называется *дробной стерилизацией*.

Вода при температуре 100°C. уничтожает вегетативные формы бактерий почти мгновенно, а споры - от пяти до пятнадцати минут. Этот метод стерилизации применим к металлическим инструментам, таким как ножи, щипцы и т.д., используемым в экспериментах на животных; шприцам, резиновым пробкам, резиновым и стеклянным трубкам и другим небольшим устройствам, и осуществляется в том, что обычно называют "водяным стерилизатором" (рис. 27).

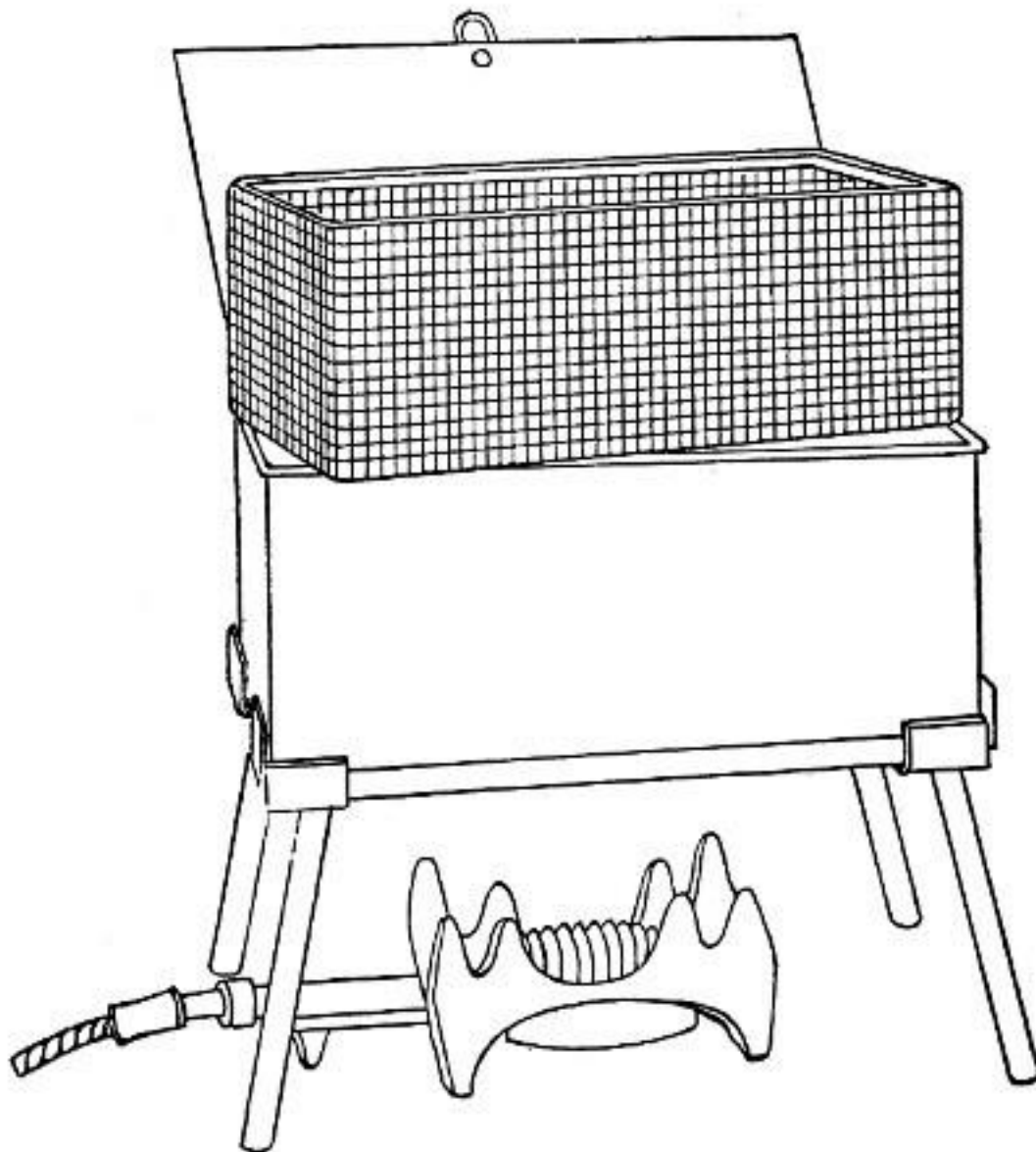


Рис.

27.стерилизатор для воды.

Это прямоугольная медная коробка длиной 26 см, шириной 18 см и глубиной 12 см, установленная на ножках, нагреваемая снизу бунзеновской или радиальной газовой горелкой и содержащая подвижный лоток для медной проволоки, на 2 см меньше во всех размерах, чем сам стерилизатор, и снабженная ручками. Верхняя часть стерилизатора откидывается, образуя крышку.

Способ.—

1. Поместите инструменты и т.д., подлежащие стерилизации, в медную корзину и установите корзину на место в стерилизаторе.
2. Налейте в стерилизатор достаточное количество воды, закройте крышку и включите газ.

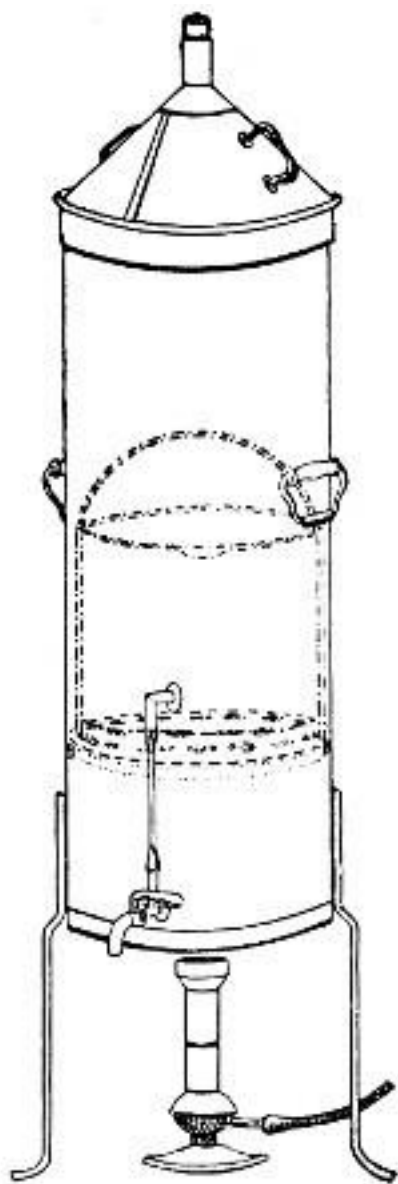


Рис. 28.Стерилизатор Коха.

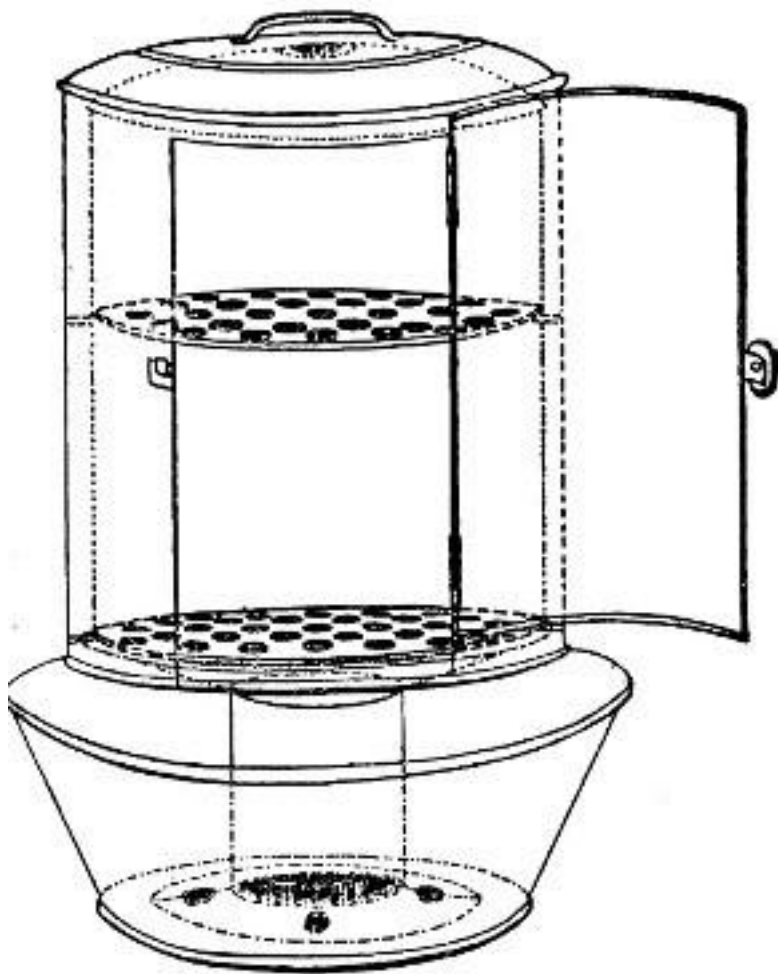


Рис. 29. Стерилизатор Арнольда.

3. После того, как вода закипит и из-под крышки в течение не менее десяти минут будет выходить пар, погасите газ, откройте крышку, достаньте проволочную корзину за ручки и поставьте ее по диагонали на стенки стерилизатора; инструменты и т.д., находящиеся в ней, теперь стерильны и готовы к использованию.

4. После использования или при случайном загрязнении положите инструменты обратно в корзину и верните их в стерилизатор; полностью продезинфицируйте, прокипятив в течение пятнадцати минут.

5. После дезинфекции, и пока все еще горячее, вынуть инструменты, просушите и сразу, и вернуть их хранения дел.

Струющийся пар—т. е. пар при температуре 100 °С. — уничтожает вегетативные формы бактерий в течение пятнадцати-двадцати минут, а споры образуются в течение одного-двух часов. Этот метод в основном используется для стерилизации различных питательных сред, предназначенных для культивирования бактерий, и осуществляется в паровом котле специальной конструкции, известном как паровой стерилизатор Коха (рис. 28) или в одной из его многочисленных модификаций, наиболее эффективной из которых является Arnold's (рис. 29).

Паровой стерилизатор в своей простейшей форме состоит из высокого цилиндрического сосуда из луженого железа или меди, разделенного на две неравные части подвижной перфорированной металлической диафрагмой, причем нижняя, меньшая часть служит резервуаром для воды, а верхняя часть предназначена для размещения проволочных корзин с предметами, подлежащими стерилизации. Сосуд закрыт неплотной конической крышкой, снабженной ручками и перфорированной на вершине трубкой; он установлен на треногой подставке и нагревается снизу горелкой Бунзена. Более сложный стерилизатор обтянут войлоком или асбестовой доской и оснащен датчиком воды, а также краном для опорожнения отделения для воды.

Использовать паровой стерилизатор.—

1. Заполните резервуар для воды до уровня перфорированной диафрагмы, установите крышку на место и зажгите горелку Бунзена.
2. После того, как вода закипит, подождите достаточно времени, чтобы пар заменил воздух в стерилизационном отделении, о чем свидетельствует пар, выходящий ровной непрерывной струей из трубочки в крышке.
3. Снимите крышку, быстро опустите проволочную корзину с пробирками со средой и т.д. В отделение для стерилизации, пока она не упрется в мембрану, и установите крышку на место.
4. По истечении двадцати минут для жидких сред или тридцати минут для твердых сред снимите крышку и извлеките корзину вместе с ее содержимым.
5. Теперь, но не раньше, погасите газ.

Примечание.—После извлечения пробирок, колб и т.д. Из парового стерилизатора их следует сразу же свободно отделить друг от друга, чтобы предотвратить конденсацию влаги на ватных пробках и ее проникновение внутрь пробирок.

Эта обработка уничтожит любые вегетативные формы бактерий; в течение нескольких часов охлаждения любые присутствующие споры прорастут, и молодые организмы будут уничтожены при повторении процесса двадцать четыре часа спустя; третья стерилизация через аналогичный промежуток времени гарантирует двойную безопасность.

Метод стерилизации путем воздействия струей пара при температуре 100° С в течение двадцати минут в каждый из трех последовательных дней называется *прерывистой* или *периодической стерилизацией*.

Воздействие пара при температуре 100 ° С в течение одного-двух часов или *непрерывная стерилизация* не всегда могут быть надежными и поэтому не рекомендуются.

Перегретый пар—т.е. пар под давлением (см. Таблицу Соотношения давления и температуры, Приложение, стр. 500) в герметичных емкостях при температуре 115 ° С — уничтожает как вегетативные, так и споровые формы бактерий в течение пятнадцати минут; если увеличить давление и температуру до 120 ° С, то та же цель достигается за десять минут. Этот метод ранее использовался для стерилизации сред (и действительно, в некоторых лабораториях он используется до сих пор), но большинство работников теперь понимают, что среды, подвергнутые воздействию этой высокой температуры, претерпевают гидролитические

изменения, которые делают их непригодными для культивирования более деликатных микроорганизмов. Использование перегретого пара должно быть почти полностью ограничено дезинфекцией таких загрязненных изделий, старых культур и т.д., с которыми невозможно справиться с помощью сухого тепла или самой печи. Стерилизация с помощью перегретого пара осуществляется в специальном котле— автоклаве Чемберленда (рис. 30). Автоклав состоит из прочного медного цилиндра, снабженного крышкой из меди или оружейного металла, которая закрепляется на месте с помощью болтов и винтов с накатанной головкой, причем соединение между цилиндром и его крышкой герметично закрывается резиновой шайбой. Крышка перфорирована для разветвленной трубки с вентиляционным краном, манометром и предохранительным клапаном. Медный котел установлен в верхней половине цилиндрического корпуса из листового железа — нижнюю половину занимают два концентрических круглых ряда горелок Бунзена, каждый круг которых имеет независимую подачу газа. Внутри котла установлена большая подвижная проволочная корзина на ножках для хранения стерилизуемых изделий.

Использовать автоклав.—

1. Упакуйте стерилизуемые изделия в проволочную корзину.
2. Налейте воду в котел до уровня дна корзины; также наполните водой находящиеся в нем колбы и пробирки.
3. Убедитесь, что резиновая шайба установлена на место, затем установите крышку на место и плотно закрепите ее на автоклаве с помощью винтов с накатанным пальцем.
4. Откройте вентиляционный кран и зажгите обе конфорки.
5. Когда пар начнет выходить ровным непрерывным потоком из вентиляционной трубки, закройте вентиляционный кран и погасите внешнее кольцо газовых горелок.
6. Подождите, пока стрелка манометра не зафиксирует температуру 120 ° C, затем отрегулируйте подачу газа и пружинный предохранительный клапан таким образом, чтобы эта температура просто поддерживалась, и оставьте так на двадцать минут. В более дорогих моделях автоклавов это регулирование предохранительного клапана осуществляется автоматически, при этом манометр оснащен регулируемой стрелкой, которая может быть установлена на любое требуемое давление-температуру и расположена таким образом, что, когда стрелка манометра совпадает с регулируемой стрелкой, предохранительный клапан открывается.
7. Погасите газ и дайте показателю манометра упасть до нуля.

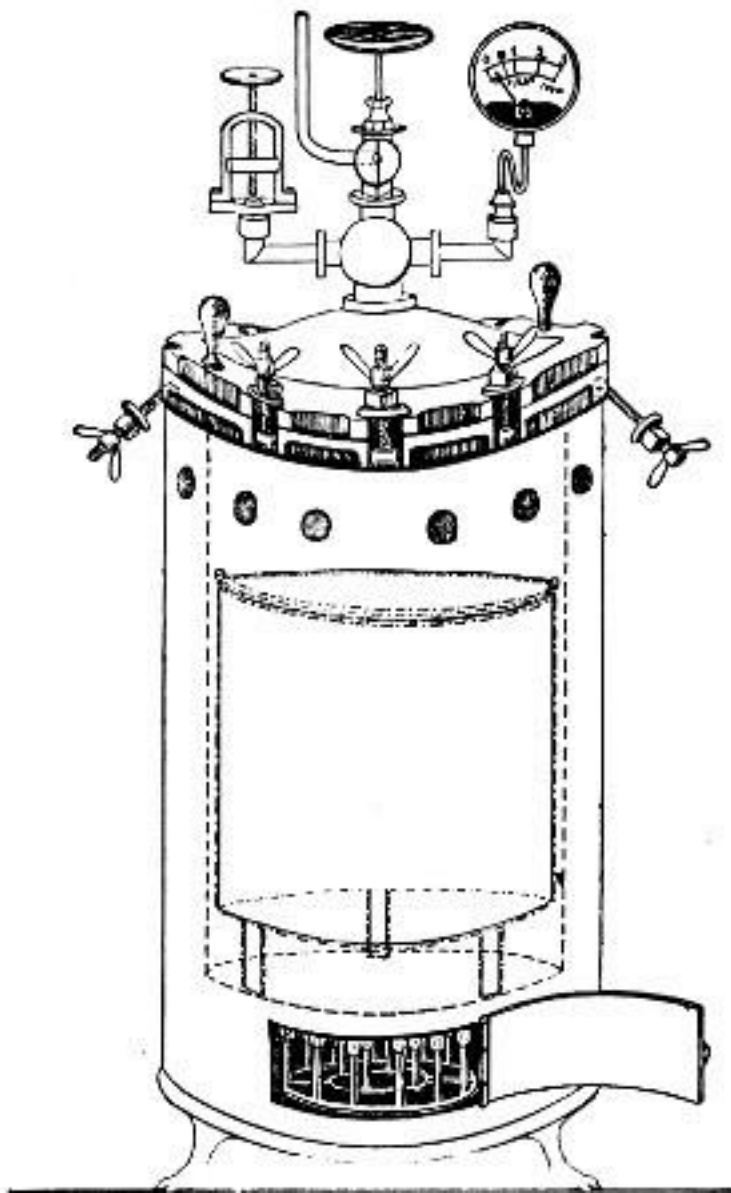


Рис. 30. Автоклав Чемберленда.

8. Теперь медленно откройте вентиляционный кран и дайте внутреннему давлению подогнаться к атмосферному.

9. Снимите крышку и достаньте стерилизованное содержимое.

Периоды стерилизации.—Чрезвычайно полезным устройством для определения сроков стерилизации (как и для многих других операций в лаборатории) является

ЧАСЫ СИНХРОНИЗАЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО СИГНАЛА.

Это часы американского типа, у которых циферблат окружен металлической пластиной с рядом из 60 отверстий на равных расстояниях друг от друга, соответствующих минутам на циферблате. Эта пластина соединена с одним из полюсов сухой батареи, другой полюс которой соединен с металлическим корпусом часов с целью приведения в действие обычного магнитного будильника. В центре каждого из отверстий в пластине закреплен металлический стержень, который затем проходит через изолирующее кольцо и выступает внутрь циферблата, где

соприкасается с часовой стрелкой. Часы установлены на массивном основании с клавиатурой, содержащей 20 пронумерованных заглушек. Если одна из вилок вставлена в отверстие в пластине, она соприкасается со стержнем, и когда часовая стрелка часов касается другого конца, цепь замыкается, и звонок начинает звонить. Период этого фрикционного контакта составляет приблизительно 20 секунд. Таким образом, часы можно использовать для электрического отсчета периодов времени от одной минуты, кратных одной минуте, до одного часа.

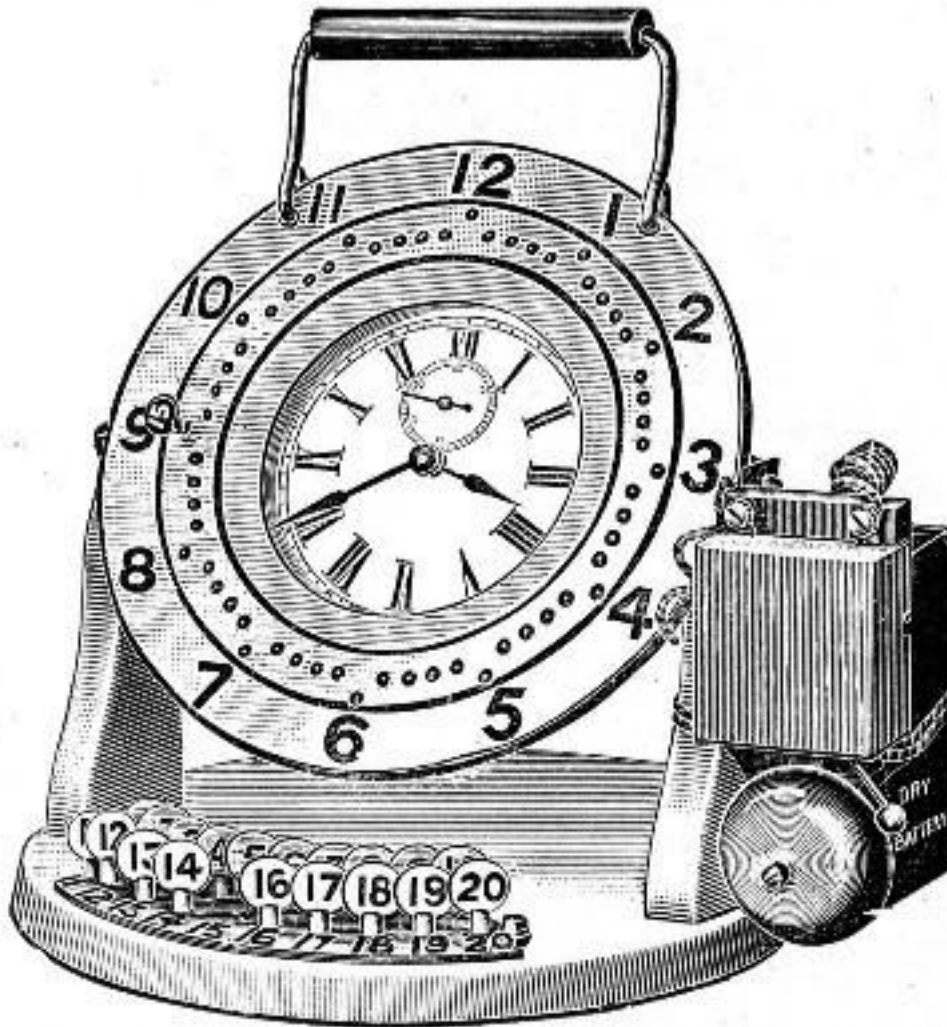


Рис. 31. Часы

синхронизации электрического сигнала.

Фильтрация.—(а) *Фильтр из ваты.*—Практически единственным методом, используемым в лаборатории для стерилизации воздуха или газа, является фильтрация через сухую вату или стекловату, волокна которых запутывают микроорганизмы и препятствуют их проникновению.

Возможно, лучшим примером такого фильтра является ватная пробка, которая закрывает горловину пробирки для культивирования. Через него происходит не только обычная диффузия, но и если пробирку, заткнутую обычным образом ватой, извлечь из горячего инкубатора, температура содержащегося воздуха быстро падает до лабораторной и образуется частичный

вакуум; воздух проходит в пробирку через ватную пробку для восстановления равновесия, и, пока пробка остается сухой, в ней нет микробов. Однако, если пробка становится влажной либо из-за всасывания из атмосферы, либо из-за соприкосновения с жидкостями, микроорганизмы (особенно плесневые грибы) начинают размножаться, и длинные нити быстро проникают в вещество пробки, получают доступ к внутренней части трубки и загрязняют ее.

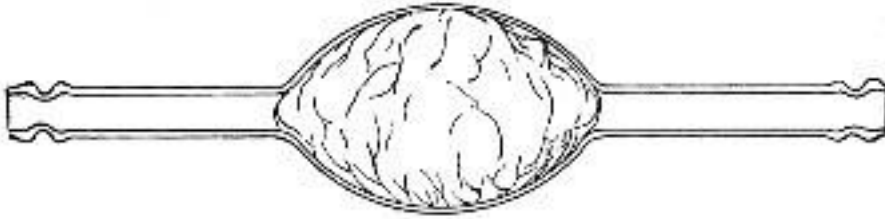


Рис. 32. Воздушный фильтр из

ваты.

Способ.—

Если требуется стерилизовать газы перед подачей в сосуд, содержащий чистый культивируемый микроорганизм, как, например, при пропускании потока кислорода через бульон для культивирования дифтерийной палочки, это можно легко осуществить следующим образом:

1. Возьмите стеклянную трубку диаметром, скажем, 1,5 см, в центре которой выдута колба, наполните колбу сухой ватой (рис. 32), оберните слоем ваты каждый конец трубки и закрепите с помощью тонкой медной проволоки или бечевки; затем стерилизуйте прибор в духовке с горячим воздухом.
2. Приготовьте культивирование в колбе Ruffer или Woodhead (рис. 33), свободный конец входной трубки которой обернут слоем ваты, закрепленной ниткой или проволокой, в то время как выходная трубка закупорена обычным способом.

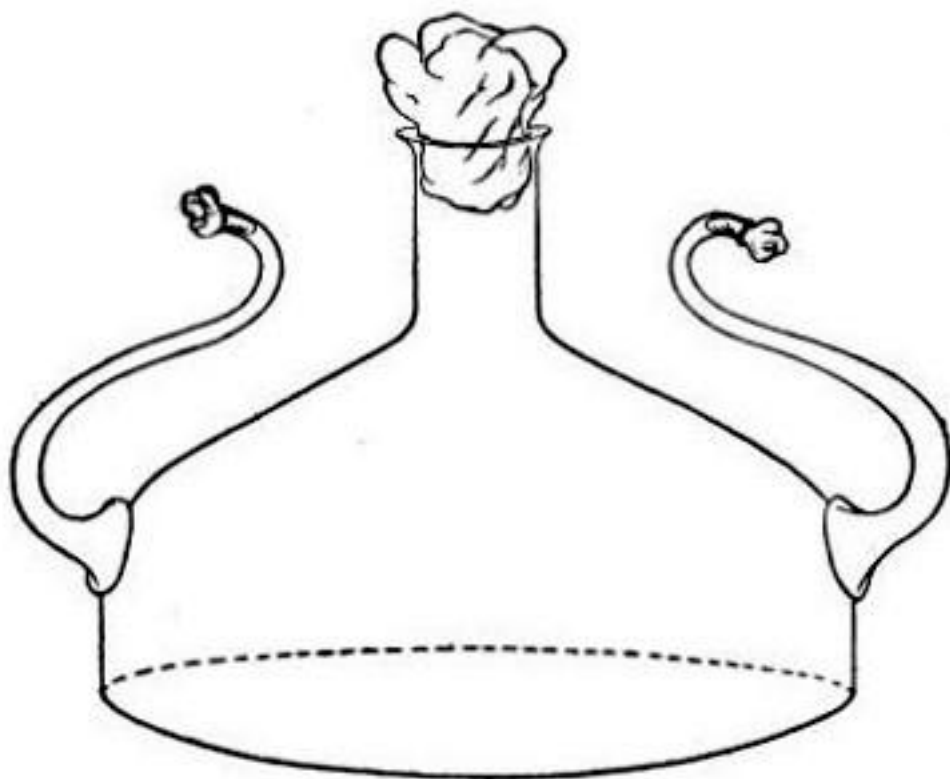


Рис. 33.—Колба

Раффера.

3. Прокипятите небольшой отрезок резиновой трубки. Перелейте ее из кипящей воды в стакан с абсолютным спиртом.

4. Когда все будет готово, выньте пинцетом резиновую трубку из спиртовки, тщательно осушите ее и пропустите через пламя горелки Бунзена, чтобы выжечь последние следы спирта.

5. Снимите ватные обертки с входной трубки колбы и с одного конца фильтровальной трубки и быстро соедините их с помощью стерильной резиновой трубки.

6. Соедините другой конец трубки баллона с подающей трубкой из резервуара для газа.

Газ, проходящий через сухую стерильную вату в колбе фильтровальной трубки, освобождается от любых содержащихся в ней микроорганизмов и поступает в колбу в стерильном состоянии.

(b) фарфоровый фильтр. Стерилизация жидкостей фильтрованием осуществляется путем пропускания их через цилиндрический сосуд, закрытый с одного конца наподобие пробирки, и изготовленный либо из пористого "бисквитного" фарфора, твердосплавного и неглазурованного (система Чемберленда), либо из кизельгура, мелкой диатомовой глины (система Беркефельда), и называемый "бужи" или "свечой" (рис. 34).

Примечание.—При выборе свечей для использования в лаборатории избегайте свечей с металлической арматурой, поскольку во время стерилизации на стыке металла и кремнистого материала образуются трещины из-за неравномерного расширения.

При этом методе бактерии удерживаются в порах фильтра, в то время как жидкость проходит через него в свободном от микробов состоянии.

Очевидно, что для эффективности поры фильтра должны быть чрезвычайно мелкими, и поэтому скорость фильтрации обычно будет низкой. Фильтрующие свечи Chamberland обладают более тонкими каналами, чем свечи Berkefeld, и, следовательно, фильтруют гораздо медленнее. Чтобы преодолеть этот недостаток, для ускорения процесса можно использовать либо аспирацию, либо давление, либо комбинацию этих двух сил.

Следует отметить, что белые фарфоровые фильтры Doultons не менее эффективны, чем свечи Chamberland, и фильтруются гораздо быстрее.

Требуется аппаратура.—

1. Разделительная воронка, содержащая нефiltroванную жидкость.
 2. Стерильная фильтровальная свеча (рис. 34), открытый конец которой снабжен резиновой пробкой (рис. 34, а), перфорированной для размещения подающей трубки разделительной воронки, а ее горлышко пропущено через большую резиновую шайбу (рис. 34, б), которая надевается на горлышко фильтровальной колбы.
 3. Стерильная фильтровальная колба подходящего размера для приема отфильтрованной жидкости, горловина которой закрыта ватной пробкой.
 4. Насос Шпренгеля с водяным инжектором (см. рис. 38, с) или насос Герика (воздушный насос гидравлического принципа, герметизированный маслом с низким давлением паров, рис. 35).
- Если используется последнее, между фильтрующей емкостью и насосом должна быть установлена бутылка Вульфа, выполненная в виде промывочной бутылки и содержащая серную кислоту, чтобы предотвратить попадание влажного воздуха в масло в насосе.
5. Воздушный фильтр (*видео*, стр. 40) стерилизован.
 6. Напорная трубка.
 7. Винтовые зажимы (рис. 36).

Способ.—

1. Соедините выпускную трубу всасывающего насоса с боковой трубкой фильтровальной колбы (предварительно сняв с нее пробку из ваты) с помощью напорной трубки, вставив, при необходимости, промывочный бачок с серной кислотой.

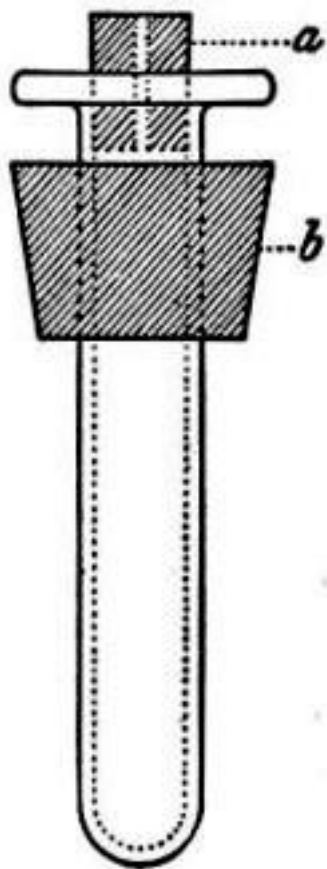


Рис. 34. фарфоровая свеча—фильтр.

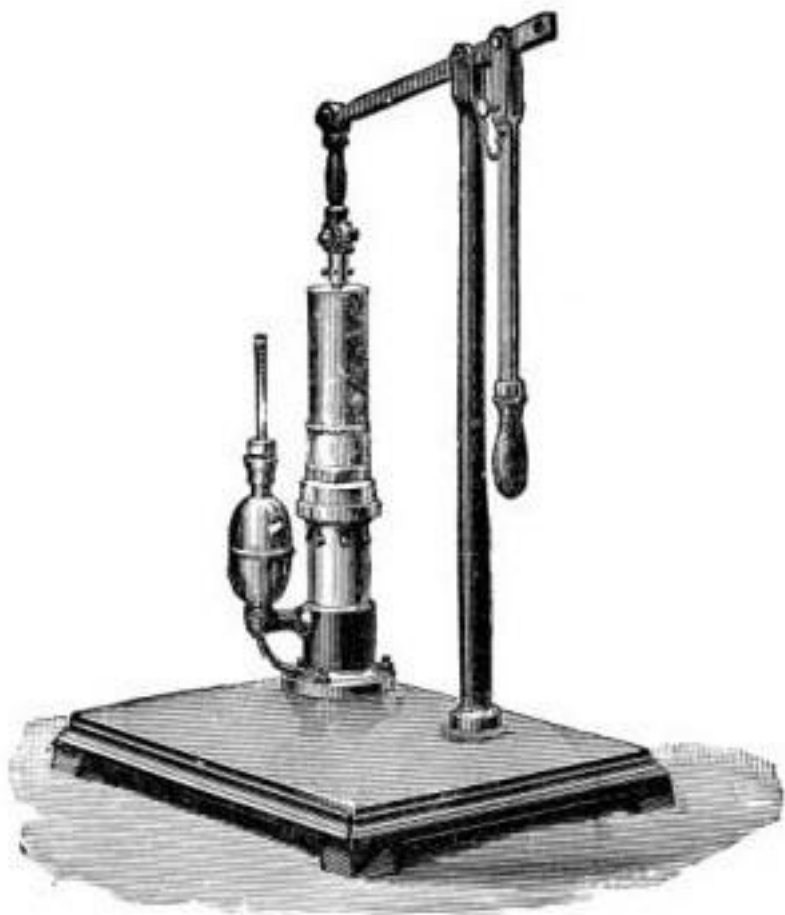


Рис. 35.—Воздушный насос Geryk.

2. Выньте ватную пробку из горлышка фильтровальной колбы и установите фарфоровую свечу на место.

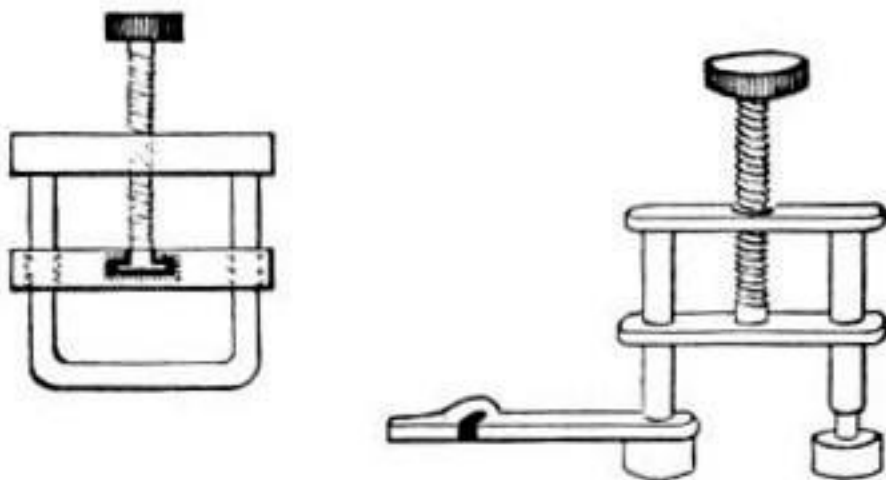


Рис. 36.Винтовые зажимы.

3. Присоедините сопло разделительной воронки к фильтрующей свече с помощью перфорированной резиновой пробки (рис. 37).

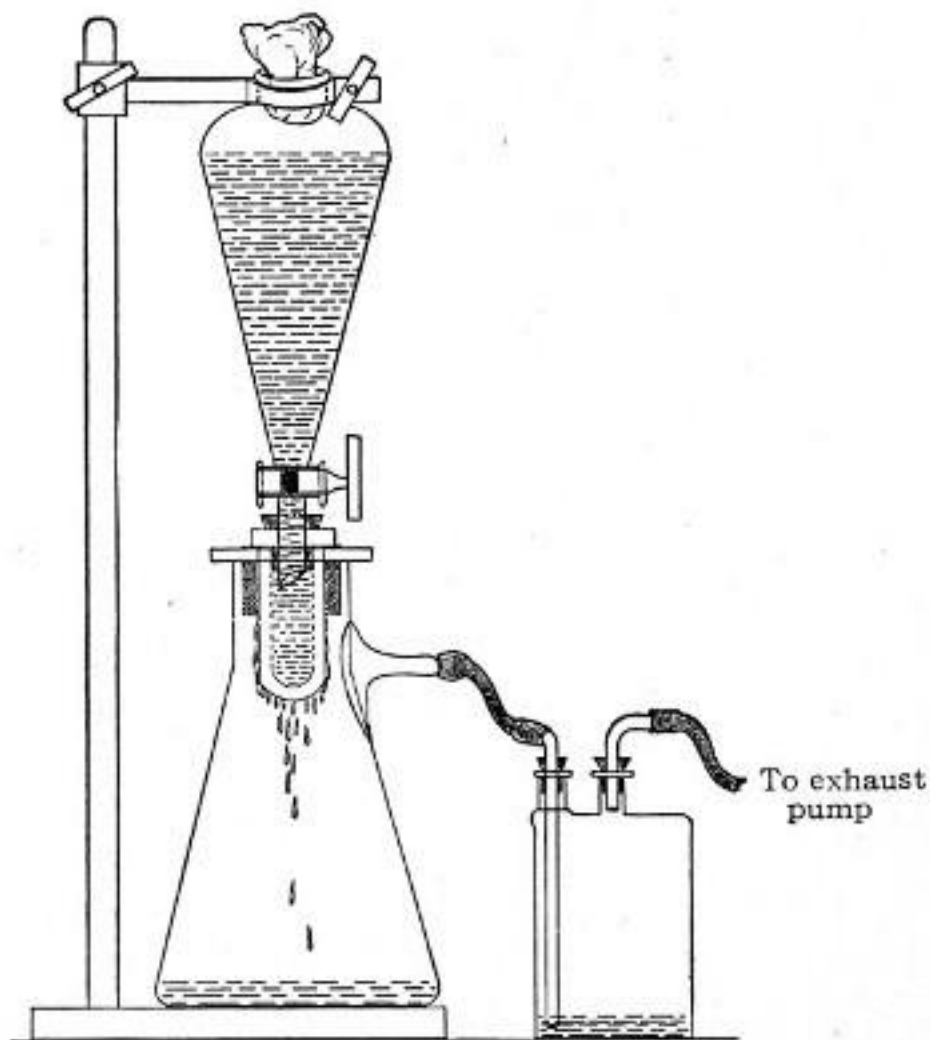


Рис. 37. Устройство для

фильтрации—аспирации.

4. Откройте кран воронки и выпустите воздух из фильтровальной колбы и промывочного бачка; поддерживайте вакуум до завершения фильтрации.

5. По завершении фильтрации закройте кран воронки; закрепите винтовой зажим на напорной трубке, прикрепленной к боковому ответвлению фильтровальной колбы; плотно завинтите ее и отсоедините емкость для промывки кислотой.

6. Прикрепите воздушный фильтр к открытому концу напорной трубки; постепенно открывайте винтовой зажим и дайте отфильтрованному воздуху попасть в колбу, чтобы устранить отрицательное давление.

7. Отсоедините резиновую трубку от бокового ответвления колбы, подожгите конец ответвления в лампе Бунзена и заткните ее отверстие стерильной ватой.

8. Извлеките фильтрующую свечу из горлышка колбы, подожгите горлышко и заткните горлышко стерильной ватой.

9. Прозеинфицируйте фильтрующую свечу и разделительную воронку кипячением.

Если окажется необходимым использовать давление в дополнение к всасыванию или вместо него, вставьте перфорированную резиновую пробку в отверстие разделительной воронки и закрепите ее на месте медной проволокой; затем проденьте через пробку кусок стеклянной трубки и подсоедините внешнее отверстие к какому-либо воздушному насосу высокого давления (один из наиболее часто используемых для этой цели ножных насосов, например, используемых для накачивания велосипедных шин) или к баллону со сжатым воздухом или другим газом.

Чтобы очень быстро отфильтровать большой объем жидкости, необходимо использовать более высокое давление, чем выдержало бы стекло, и в этих случаях следует использовать металлический сосуд, разработанный компанией Pakes (рис. 38, а), вмещающий саму фильтрующую свечу, а также жидкость, подлежащую фильтрации. (В фильтровальной колбе также необходимо поддерживать вакуум с помощью вытяжного насоса в течение всего процесса.)

Это устройство состоит из латунного цилиндра емкостью 2500 °с с двумя выступами и отверстиями в горловине на каждом конце, снабженными винтовой резьбой.

Гайка с манометром вставляется в верхний винт; а в нижний вставлен латунный цилиндр с фильтрующей свечой, который продолжается вниз до нагнетательной трубки. Утечка предотвращается с помощью резиновых шайб.

В верхний выступ вставляется трубка, согнутая под прямым углом и снабженная отводом. Вся латунная фурнитура изнутри залужена (рис. 38, а). При использовании резервуар обычно устанавливается на штативную подставку.

Стерилизовать.—

1. Вставьте свечу фильтра в цилиндр и слегка прикрутите ее.

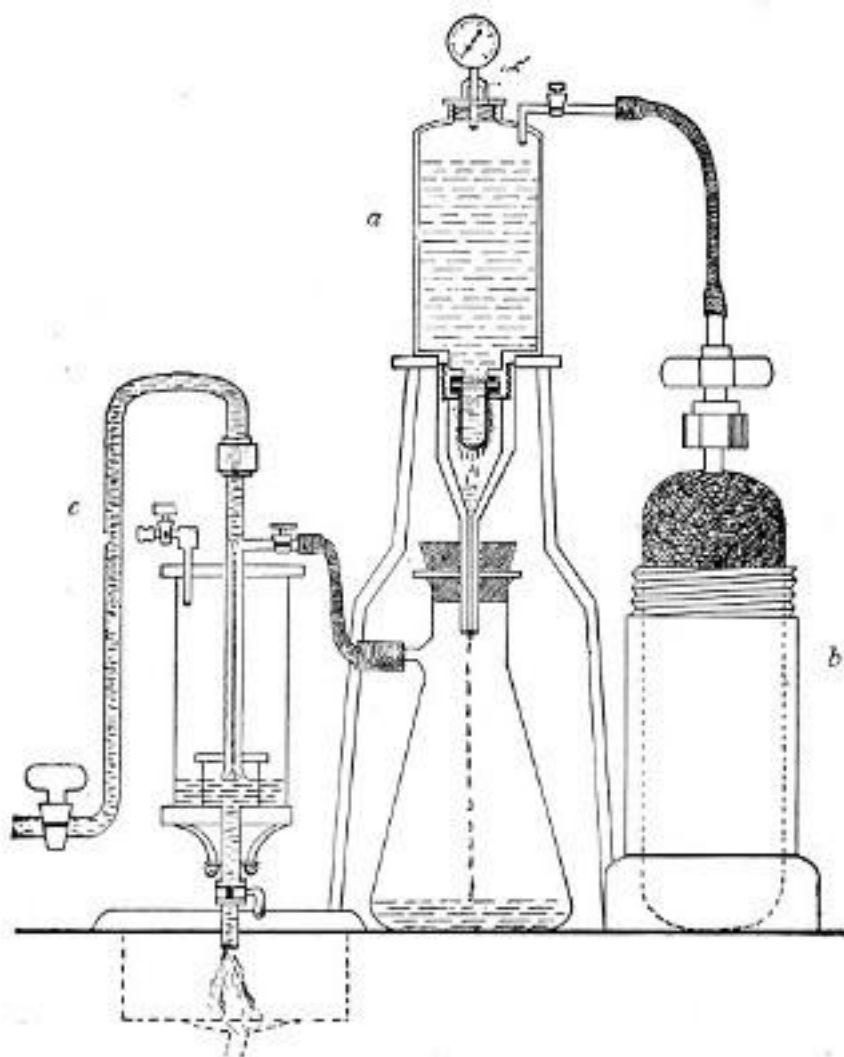


Рис. 38.Фильтрация Pakes в пласте

—давление и аспирация.

2. Оберните подающую трубку слоем ваты и закрепите на месте.
3. Снимите гайку крепления манометра и заткните горловину ватой.
4. Нагревайте все устройство в автоклаве при температуре 120°C в течение двадцати минут.

Способ.—

1. Извлеките прибор из автоклава и дайте ему остыть.
2. Прикрутите коробку с бужи на место.
3. Установите устройство на место так, чтобы его подающая трубка (с которой была снята обертка из ваты) проходила через перфорированную резиновую пробку в горловине фильтровальной колбы.

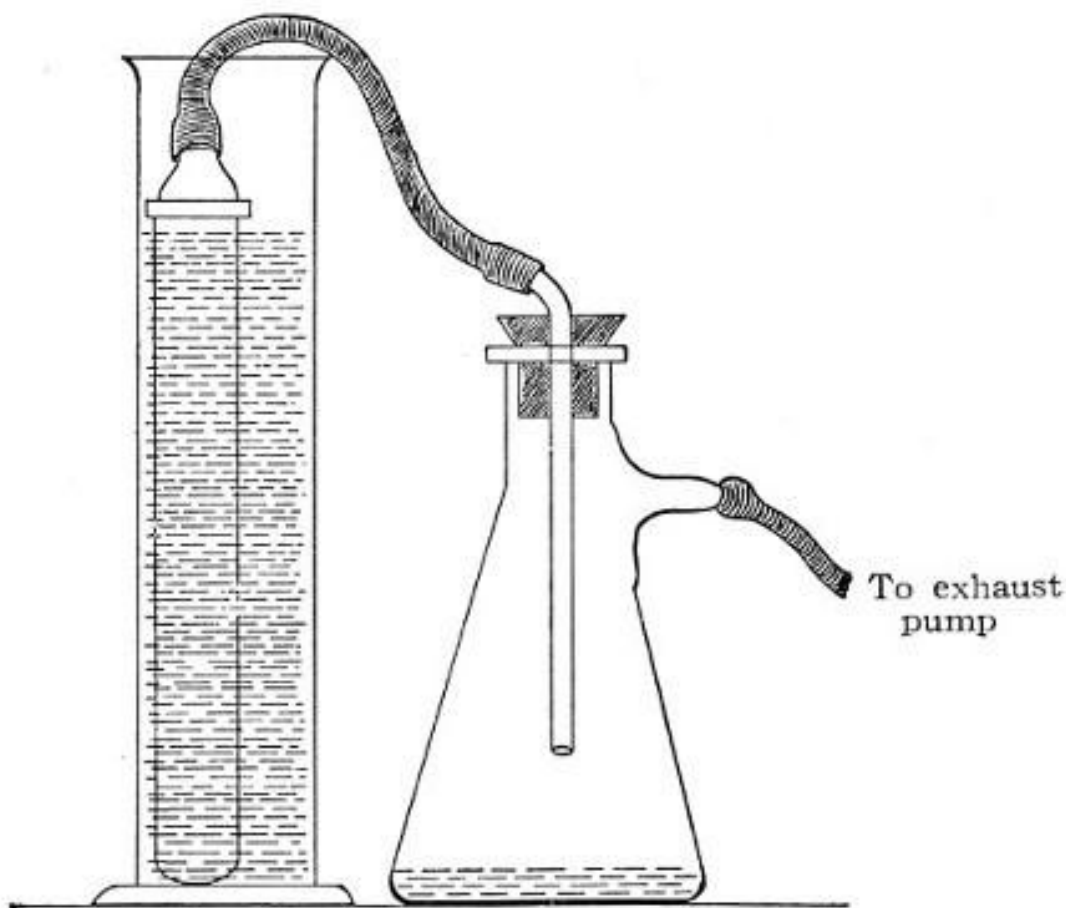


Рис. 39.Закрытая

свеча, предназначенная для фильтрации.

4. Залейте фильтруемую жидкость в цилиндр и закрутите гайку с манометром. (Перед закручиванием эту гайку следует погрузить в кипящую воду на несколько минут, чтобы простерилизовать.)

5. Соедините горизонтальный патрубок входной трубки с баллоном со сжатым кислородом (или углекислым газом, рис. 38, б) с помощью напорной трубки.

6. Соедините боковой рычаг фильтровальной емкости с вытяжным насосом (рис. 38, с) и запустите последний в работу.

7. Откройте кран газового баллона; затем откройте кран на входной трубке фильтрующего баллона и повышайте давление внутри него до тех пор, пока на манометре не будет зафиксирована нужная точка. Поддерживайте это давление, обычно одну или полторы атмосферы, до завершения фильтрации, регулируя кран на входной трубке.

Некоторые формы фильтрующих свечей изготавливаются с открытым концом, заключенным в нагнетательное сопло, которое покрыто глазурью. В этом случае устройство оснащено несколько иным образом; жидкость, подлежащая фильтрации, содержится в открытом цилиндре, в который погружается свеча, в то время как ее нагнетательный патрубок соединен с фильтровальной колбой с помощью гибкой напорной трубки (предварительно стерилизованной кипячением), как показано на рисунке 39.

IV. МИКРОСКОП.

Основные требования к микроскопу для бактериологической работы можно кратко изложить следующим образом:

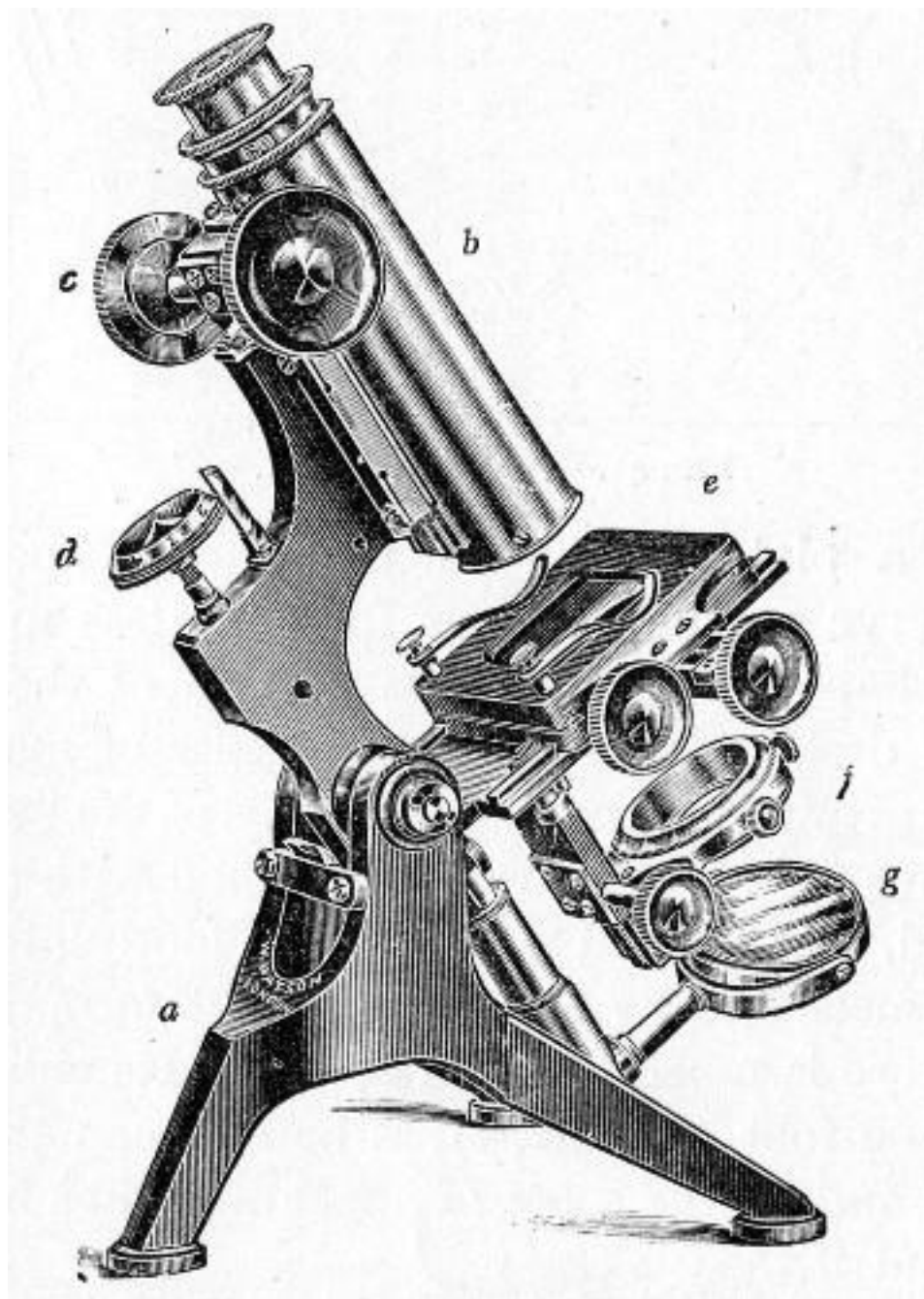


Рис. 40.—Подставка для

микроскопа.

Инструмент монокулярного типа должен быть хорошего качества и хорошо обработан, жестким, незыблемым и не подверженным вибрации не только в вертикальном положении, но и при

наклоне под углом или в горизонтальном положении. Различные соединения и движения должны выполняться плавно и точно, в равной степени без таких дефектов, как "потеря времени" и "скольжение". Все винты и т.д. должны соответствовать стандарту Королевского микроскопического общества. Он также должен быть снабжен хорошими объективами и достаточно большой сценой. Ниже приведены детали его составных частей, на которые необходимо обратить особое внимание:

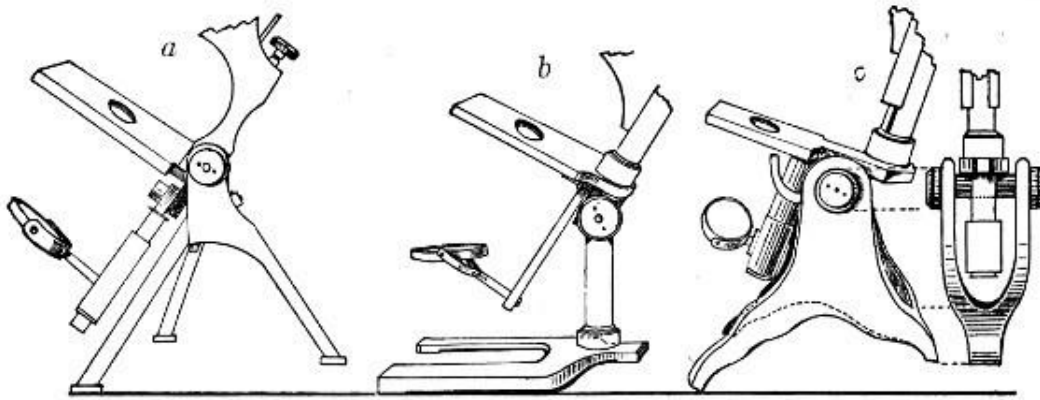


Рис. 41.Ножка,

трех типов.

1. Основание или Стопа (рис. 40, а).—Две элементарные формы — тренога (рис. 41, а) и вертикальный столбик, вставленный в пластину, известную как "подкова" (рис. 41, б) — служат образцами для бесчисленных модификаций формы и размера этой части подставки. Главное пожелание — устойчивость и простота манипулирования - достигается в первом случае за счет "раздвигания" трех ножек, которые обычно обуты в пробковые ботинки; во втором - за счет собственного веса опорной пластины. Штатив имеет механически более правильную форму, и для практического использования он является гораздо более предпочтительным. Его главный конкурент, стопа Джексона (рис. 41, с), основана на том же принципе и по внешнему виду может многое рекомендовать.

2. В теле пробки (фиг. 40, Б) может быть либо то, что известно как "долгий" или "английский" (длина 250 мм), или "короткое" или "континентальный" (длина 160 мм). Ни длина-видимому, обладает каким-либо материальное преимущество над другой, но это абсолютно необходимо для решения задач, которые были изготовлены для определенной выбранной длины трубы. В современных микроскопах высокого класса основная трубка обычно короче, чем у Continental, но снабжена вытяжной трубкой, которая при полном вытягивании дает длину трубки больше, чем у английского, что позволяет использовать объектив любой формы.

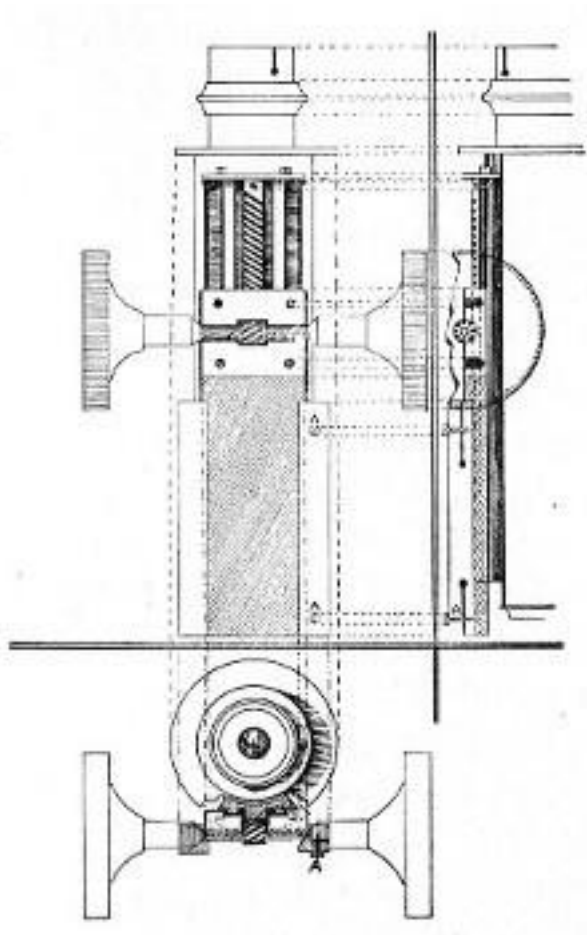


Рис. 42.—Грубая регулировка.

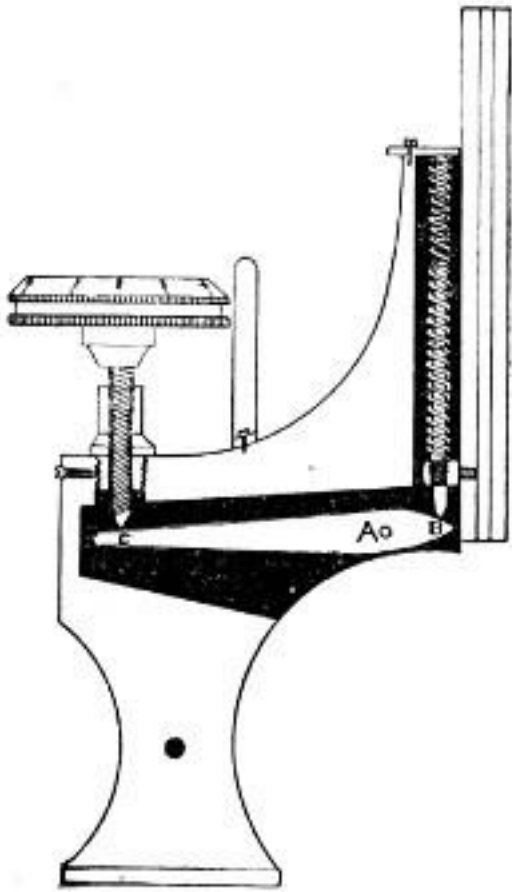


Рис. 43. Точная регулировка.

Для практических целей длина трубки равна расстоянию от конца мочки носа до окулярного стекла. Это измерение упоминается, когда говорят о "длинной" или "короткой" трубке.

3. Грубая регулировка (рис. 40, с) должна осуществляться с помощью реечной передачи, устойчивость и плавность действия которой обеспечивается с помощью точно подогнанных подшипников в виде "ласточкиных хвостовиков" и идеального соответствия между зубьями рейки и лепестками шестерни (рис. 42). Также следует предусмотреть устранение "провисания" (например, с помощью винтов АА, рис. 42).

4. Точная регулировка (рис. 40, d) ни в коем случае не должна зависеть от прямого действия пружин, а должна выполняться по схеме рычага, предпочтительно Нельсона (рис. 43). В этой форме неравная длина плеч рычага обеспечивает очень деликатное перемещение, и, более того, лишь небольшая часть веса корпусной трубки передается на резьбу вертикального винта, приводящего в действие перемещение.



Рис. 44.Шпиндельная головка для точной регулировки.

Шпиндельная фрезерная головка (рис. 44) будет сочтена очень полезным устройством, которое можно установить вместо обычной фрезерной головки, управляющей точной регулировкой. В этом устройстве ось фрезерованной головки вытянута вверх в виде короткого столба, диаметр которого составляет одну шестую диаметра головки. Шпиндель можно быстро вращать пальцами для регулировки средней мощности, в то время как более крупную фрезерную головку можно медленно перемещать при фокусировке высокой мощности.

5. Подставка (рис. 40, е) должна быть квадратной формы и большой по площади — не менее 12 см. — плоской и жесткой, чтобы обеспечить надежную опору для чашки Петри, используемой для выращивания пластинок; и должна быть снабжена пружинными зажимами (снимаемыми по желанию) для крепления предметных стекол размером 3 на 1.

Механическая стадия должна рассматриваться как необходимость, а не роскошь для бактериолога, поскольку при работе с высокой мощностью, и особенно при исследовании образцов, находящихся в подвешенном состоянии, практически невозможно выполнять достаточно деликатные движения пальцами. При выборе механической ступени предпочтение следует отдавать той, которая является неотъемлемой частью инструмента (рис. 45), а не той, которая должна крепиться к обычной плоской ступени каждый раз, когда это требуется, и ее перемещениями следует управлять с помощью стационарных фрезерованных головок (рис. 45, АА'). Немаловажным моментом является форма отверстия; оно должно быть квадратным, чтобы позволять свободное перемещение по промежуточному конденсатору. На механической ступени должны быть установлены три (съёмных) резьбовых шпильки для использования вместо

выдвижной планки, так что при желании можно использовать нониусный измеритель (рис. 45, *BB'*), который обычно устанавливается на ступени этого класса, или измеритель солодового дерева.

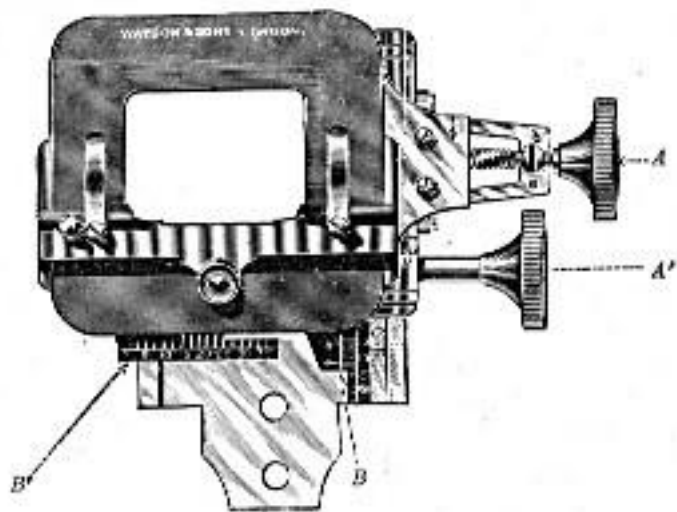


Рис. 45.—Механическая ступень.

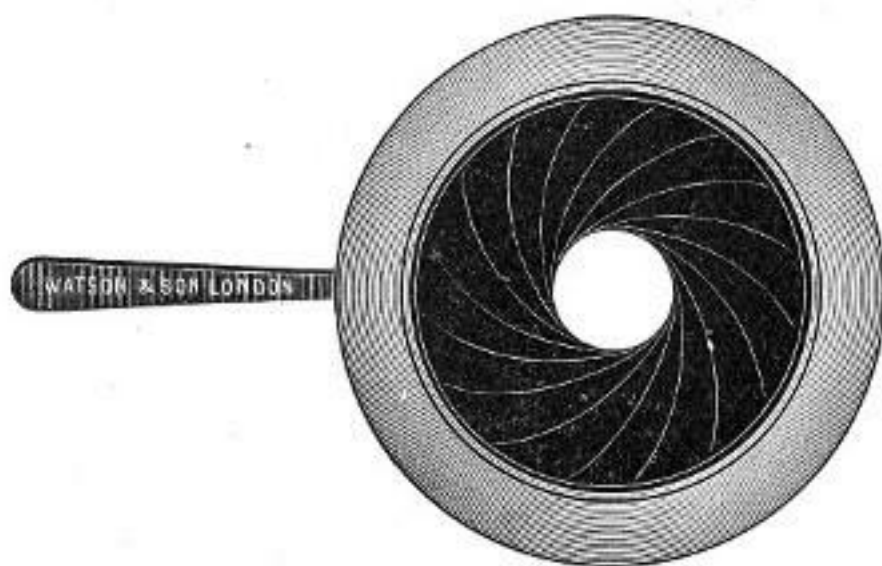


Рис. 46.Ирисовая диафрагма.

6. Диафрагма.— Следует избегать использования отдельных отдельных диафрагм; предпочтительнее вращающаяся пластина с отверстиями разного размера, закрепленная под ступенью, но, несомненно, лучшей формой является "ирисовая" диафрагма (рис. 46), которая входит в конструкцию конденсатора промежуточной ступени.

7. Промежуточный конденсор *substage condenser* является необходимой частью оптического оборудования. Его назначение состоит в том, чтобы собрать пучок параллельных лучей света, отраженных плоским зеркалом, благодаря системе линз с короткой фокусировкой, в конус с большой апертурой (по желанию можно уменьшить с помощью ирисовой диафрагмы, установленной как часть конденсора), который может быть точно сфокусирован на плоскости объекта. Такую фокусировку необходимо выполнять заново для каждого объекта из-за разницы в толщине слайдов.

Наиболее распространенная форма известна как Аббе (рис. 47) и состоит из плосковыпуклой линзы, установленной над двояковыпуклой линзой. Эта комбинация устанавливается в держателе с винтовым центрированием, известном как подступенка под ярусом микроскопа (рис. 40 f), и должна быть точно отрегулирована таким образом, чтобы ее оптическая ось совпадала с оптической осью объектива. Вертикальное перемещение всего вспомогательного устройства, осуществляемое с помощью зубчатой рейки, является несомненным преимуществом, и следует предусмотреть некоторые средства для временного снятия конденсора с оптической оси микроскопа.

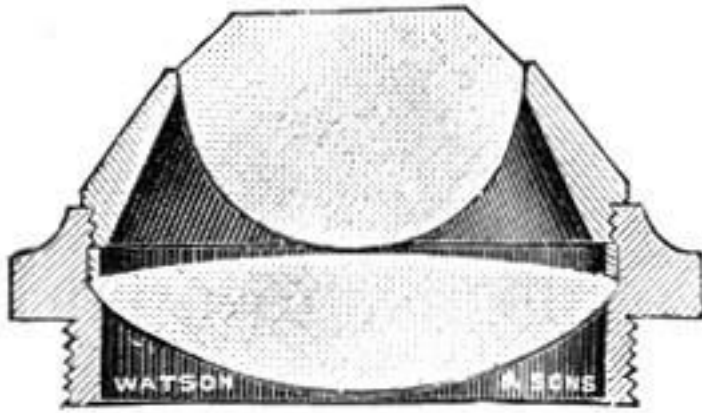


Рис. 47—Оптическая часть осветителя Abbé.

Однако для получения полной характеристики объектива с масляным иммерсионным объективом следует использовать **ахроматический конденсор**, дающий световой конус около 0,9. Обычно предполагается, что для хорошего объектива требуется конус освещения, эквивалентный двум третям его числовой апертуры. Лучший конденсор Аббе пропускает конус около .45 в то время как диафрагма иммерсионных линз диаметром 1/12 дюйма разных производителей варьируется от 1,0 до 1,4, следовательно, эффективность этих линз значительно снижается, если конденсором является просто Аббат. Эти усовершенствованные конденсаторы должны быть абсолютно центрированы по отношению к объективу и обеспечивать очень точную фокусировку, в противном случае большая часть их ценности теряется.

8. Зеркала.—Под конденсатором дополнительного уровня прикреплен гимнастический мяч, имеющий обратимую круглую раму с плоским зеркалом с одной стороны и вогнутым зеркалом с другой (рис. 40, g). Обычно используется плоское зеркало, но иногда, как, например, при использовании малой мощности и при опущенном конденсаторе, смещенном от оптической оси, используется вогнутое зеркало.

9. Окуляры, или Окулярнозлы.—Тех, что известны как окуляры Гюйгени (рис. 48), будет достаточно для любой обычной работы, не прибегая к более дорогим "компенсационным" окулярам. Два или три, увеличивающие "реальное" изображение (формируемое объективом) в четыре, шесть или восемь раз соответственно, образуют полезное оборудование.

В качестве дополнительного оборудования **Окуляр Эрлиха** является очень полезным прибором, когда необходимо провести подсчет клеток или бактерий. Это обычный окуляр, оснащенный регулируемой квадратной диафрагмой, приводимой в действие рычагом, выступающим сбоку крепления. На одной из сторон квадрата сделаны три надреза, и при перемещении рычага

квадратное отверстие может быть уменьшено до трех четвертей, половины или одной четверти первоначального размера.

10. Цели.— Необходимы три объектива: один для работы с низким энергопотреблением - *например*, 1 дюйм, 2/3 дюйма или 1/2 дюйма; один для работы с большим энергопотреблением —*например*, масляная иммерсионная линза диаметром 1/12 дюйма; и промежуточный объектив "средней мощности" -*например*, 1/6 дюйма или 1/8 дюйма (сухой). Эти линзы необходимо тщательно подбирать, уделяя особое внимание следующим моментам:

(a) *Коррекция сферической аберрации.*—Сферическая аберрация приводит к получению нечеткого изображения из-за того, что центральный и периферийный лучи фокусируются в разных точках.

(b) *Коррекция хроматической аберрации.*—Хроматическая аберрация приводит к появлению цветной полосы по краям объектов из-за того факта, что разноцветные лучи спектра обладают различной преломляемостью и что простая линза действует на них как призма.

(c) *Плоскостность поля.*— Идеальное поле зрения должно быть большим и, прежде всего, *плоским*; другими словами, объекты на периферии поля зрения должны быть так же отчетливо "в фокусе", как и объекты в центре. Однако, к сожалению, это оптическая невозможность, и поле всегда имеет сферическую форму. Некоторым производителям удастся выделить большую центральную область, которая находится в фокусе внимания одновременно, чем другим, и хотя теоретически это может привести к бесконечно малой потере других качеств, к этому всегда следует стремиться. Последовательные зоны и все периферийное кольцо должны попасть в фокус при изменении точной настройки. Такая одновременная четкость всего круга является показателем идеального центрирования всех линз в объективе.

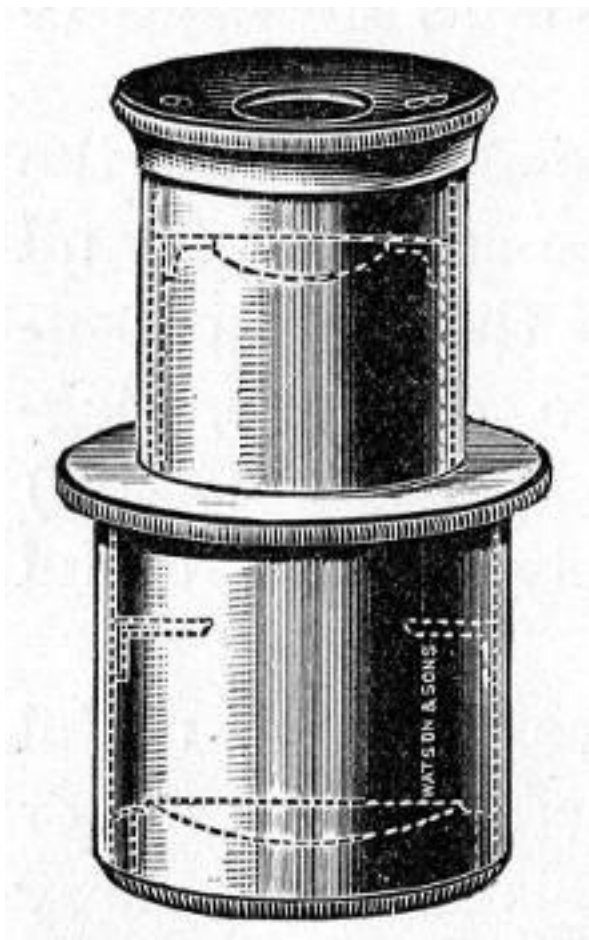


Рис. 48. Гюйгеновский окуляр.

(d) *Хорошее определение.*—Фактическое увеличение, в определенных пределах, конечно, имеет меньшую ценность, чем четкое определение и высокая разрешающая способность, поскольку именно от этих свойств зависит наше знание детальной структуры исследуемых объектов.

(e) *Числовая апертура (N. A.).*— Числовая апертура может быть определена в общих чертах как отношение *эффективного* диаметра задней линзы объектива к ее эквивалентному фокусному расстоянию. Определение этой точки - процесс, требующий значительных технических навыков и математических способностей, и он полностью выходит за рамки возможностей обычного микроскописта.^[1]

Хотя с увеличением мощности, соответственно, становится трудно комбинировать все эти поправки в одном объективе, в современных "ахроматических" объективах они достигают высокого уровня совершенства и, таким образом, устраняют необходимость в использовании более дорогих и менее долговечных апохроматических линз.

При выборе целей наилучшими "тестовыми" объектами для использования являются:

- | | | |
|---|---|-------------------|
| 1. Тонкий (слой в одну клетку), ровный | } | { 1", 2/3", 1/2": |
| "кровавая пленка", окрашенная пятном Дженнера | } | для { 1/6", 1/8" |
| или пятном Романовски. | } | { 1/12 " масло |

2. Тонкий препарат для укрывного слоя	}	
молодого сорта	}	{1/8 " сухой
{1/8"сухого"..... дифтерий (показан	}	для {
сегментации), окрашенный	}	1/12"масляным
метиленовым синим.		

Аксессуары.—Тени для век (рис. 49).—Этот прибор состоит из грушевидного куска почерневшего металла или эбонита, прикрепленного шарнирно к кольцу, которое вращается в верхней части корпуса микроскопа. Его можно использовать для того, чтобы скрыть изображение окружающих объектов от постороннего глаза, и при проведении длительных наблюдений оно окажется весьма полезным.

Наконечник для носа.— Возможно, наиболее полезным аксессуаром является окуляр для ношения двух объективов (рис. 50), а еще лучше - всех трех (рис. 51). Этот наконечник, предпочтительно изготовленный из алюминия, должен быть закрытого типа, состоящий из изогнутой пластины, прикрепленной к нижнему концу трубки корпуса, с вырезанным круглым отверстием, соответствующим просвету этой трубки. К нижней поверхности этой пластины прикреплена аналогично изогнутая пластина, снабженная тремя трубками, на каждой из которых установлен объектив. Вращая нижнюю пластину, каждый из объективов можно последовательно подвести к оптической оси микроскопа.

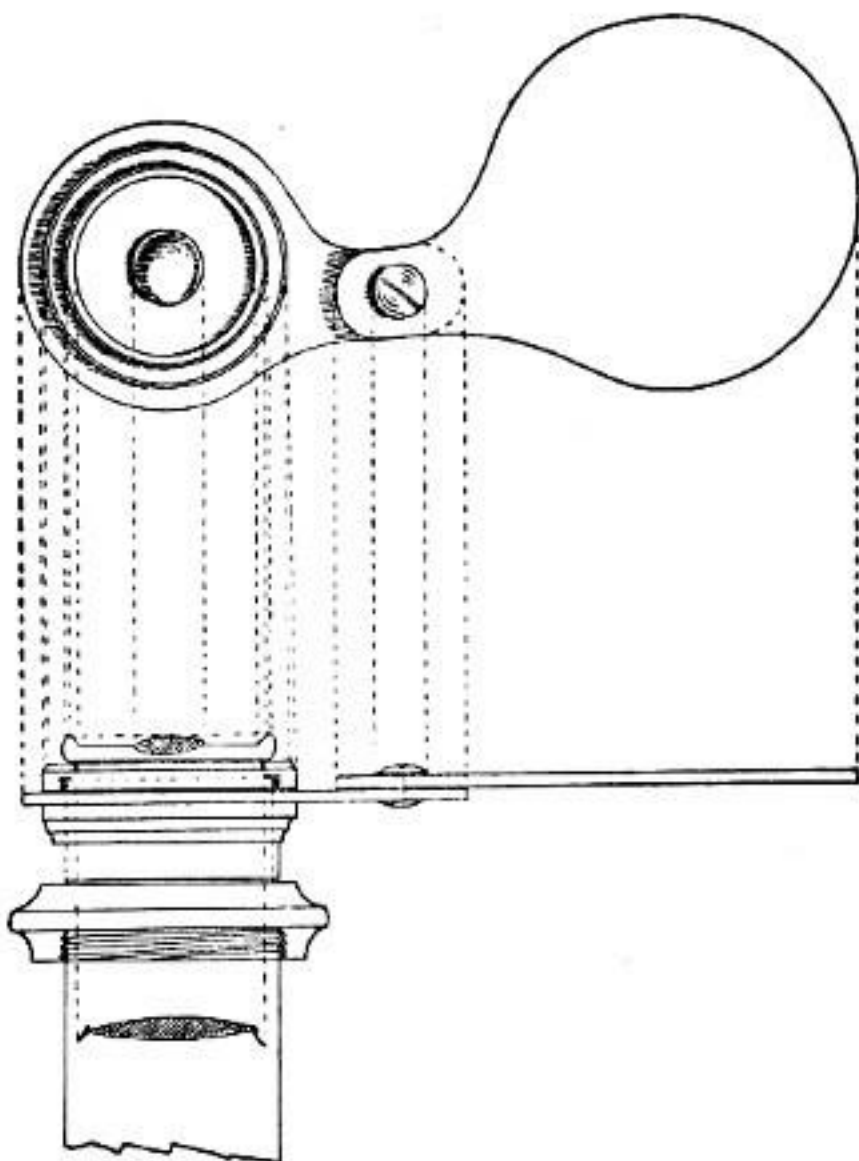


Рис. 49—Тени для век.

Однако для ответственных работ, особенно для фотомикрографии, сменный окуляр ни в коем случае не идеален, поскольку обеспечить точное центрирование каждой линзы по оптической оси практически невозможно. Поэтому для специальных целей необходимо использовать специальный окуляр, например, производства Zeiss или Leitz, в который каждый объектив вставляется на своем собственном держателе и на котором он точно центрируется.



Рис. 50.Двойной наконечник.

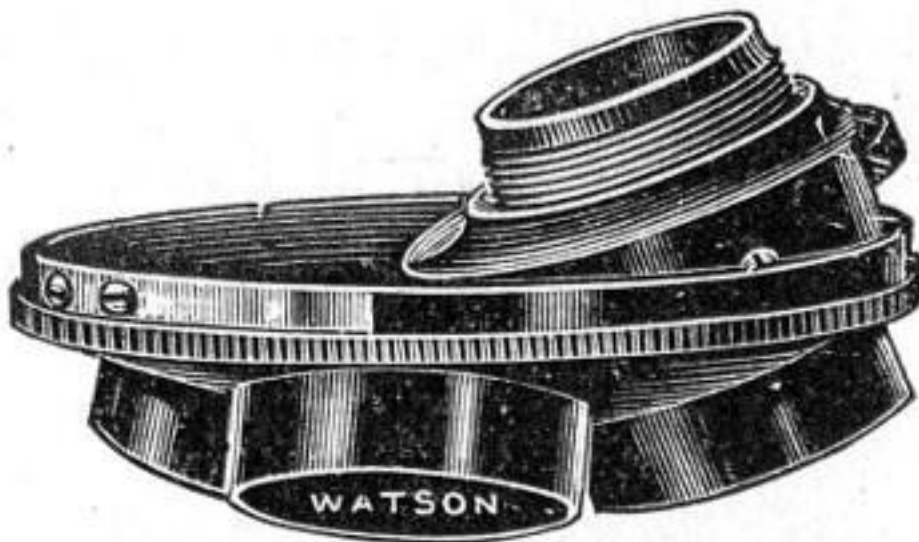


Рис. 51.—Тройной

наконечник.

Теплая стадия (рис. 52).— Это плоский металлический корпус, содержащий систему трубок, по внутренней поверхности которых может циркулировать вода любой требуемой температуры. Он предназначен для крепления к подставке микроскопа с помощью винтов $A A'$ и перфорирован большим отверстием, совпадающим с оптической осью микроскопа; короткая трубка B , выступающая с одного конца теплой подставки, позволяет отводить воду желаемой температуры из резервуара по длинной резиновой трубке внутрь подставки, а аналогичная трубка на другом конце B' подставки обеспечивает отвод сточных вод. Повышая температуру размещенных на нем препаратов в виде висячих капель и т.д. Выше температуры окружающей атмосферы, теплая стадия делает возможными точные наблюдения за прорастанием спор, культивированием в виде висячих капель и т.д.

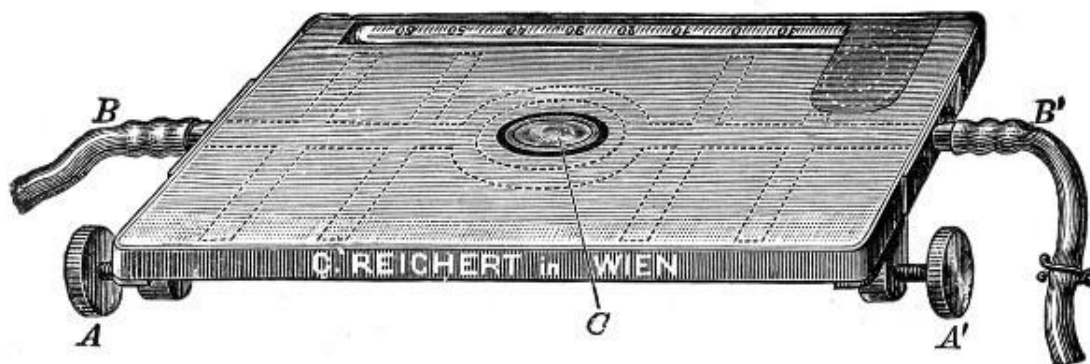


Рис. 52.—Стадия

разогрева.

Лучшей формой является электрическая горячая ступень, разработанная Лоррейн Смит;^[2] для этого требуется добавить сопротивление лампы и скользящий реостат, а также тонкие показания амперметра до 0,01 ампера. Он состоит из деревянной рамы, поддерживающей плоскую стеклянную колбу с длинным горлышком, загнутым вверх под тупым углом (рис. 53). Колба заполнена жидким парафином, который поднимается в открытом горлышке при расширении под действием тепла. На горлышке также установлен термометр. Два витка

манганиновой проволоки, пропущенные в парафине с противоположных сторон колбы (вне поля зрения), соединены с латунными выводами на деревянной раме платиновой проволокой, вплавленной в стекло. Сопротивление двух последовательно соединенных катушек составляет около 10 Ом. Необходим ток в 2-1 / 2 ампера, который подводится к катушкам каскада через реостат. С помощью амперметра можно получить и поддерживать любую желаемую температуру, примерно до 200 ° С. Если между верхней линзой конденсора и нижней поверхностью колбы установлен иммерсионный масляный контакт, этот этап действительно очень хорошо работает с масляной иммерсионной линзой диаметром 1/12 дюйма.

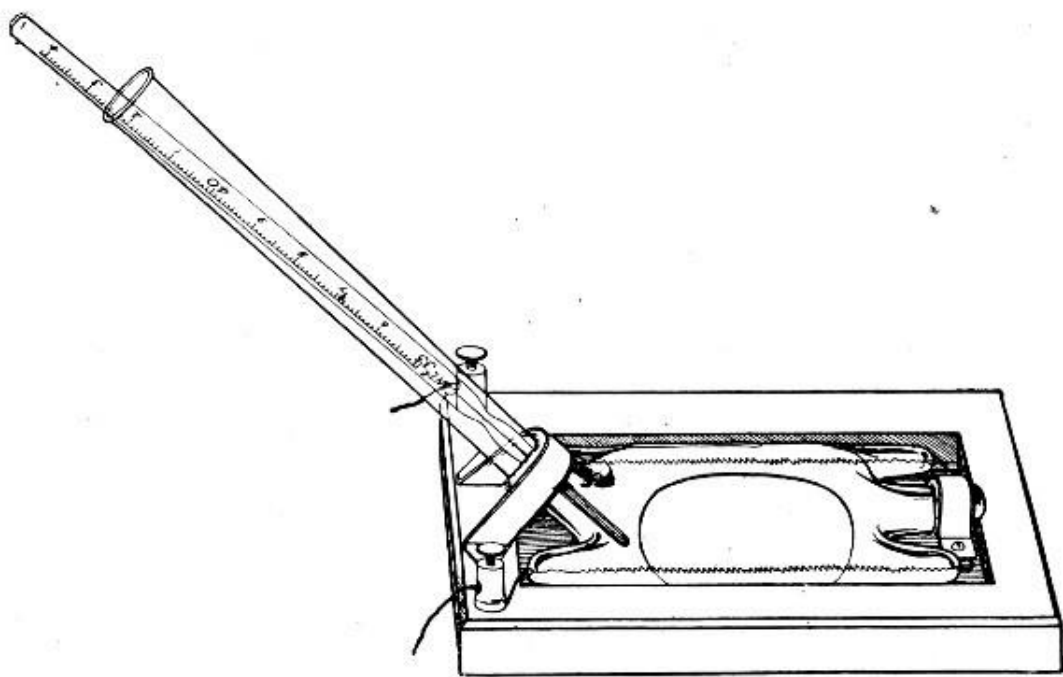


Рис. 53. Теплая

стадия Лоррейн Смит.

Конденсатор с темным грунтом или параболоидом. — Это иммерсионный конденсатор с высокой светосилой, с помощью которого неокрашенные объекты, такие как бактерии, могут быть показаны в виде ярко-белых частиц на плотном черном фоне. Центральные лучи света блокируются с помощью непрозрачного ограничителя, в то время как периферийные лучи отражаются от параболоидальных сторон конденсатора и преломляются рассматриваемым объектом. Для получения наилучших результатов с конденсаторами этого типа необходим мощный источник света, такой как небольшая дуговая лампа или газовая лампа накаливания, а также подобранные предметные стекла определенной толщины (указанной для конкретной марки конденсатора, но обычно 1 мм) и специально тонкие защитные стекла (не более 0,17 мм.). NA объектива не должен превышать 1,0, следовательно, иммерсионные линзы должны быть оснащены внутренним ограничителем для уменьшения диафрагмы.

Микрометр. — Микрометр той или иной формы также необходим для измерения бактерий и других объектов. Подробную информацию о тех, которые используются повсеместно, можно найти на следующих страницах.



Рис. 54 —Маркер объекта в виде ромба.

Указатель объектов (рис. 54).— Это чрезвычайно полезная часть устройства. Линзы, выполненные в форме объектива, заменены алмазным наконечником, слегка смещенным от центра, который можно поворачивать с помощью фрезерованной пластины. Привинченный к окуляру вместо объектива, вращающийся алмазный наконечник очерчивает небольшой круг на предметном стекле для постоянной записи положения интересующей части образца. Ромб установлен на пружине, которая регулирует давление, а размер круга можно регулировать с помощью бокового винта.

МЕТОДЫ МИКРОМЕТРИИ.

Единицей длины, применяемой для измерения микроскопических объектов, является тысячная доля миллиметра (0,001 мм), обозначаемая *микрон* (иногда и ошибочно именуемая микромиллиметром) и обозначаемая в письменной форме греческой буквой μ . Из множества методов, используемых для измерения численности бактерий, здесь будут описаны только три, а именно:

(a) С помощью камеры Lucida.

(b) С помощью окулярного микрометра.

(с) С помощью филирного микрометра (микрометрический окуляр Рамсдена).

Для каждого из этих методов необходим **ступенчатый микрометр**. Это стеклянная пластинка размером 3 на 1 дюйм, на которой выгравирована шкала, разделенная на сотые доли миллиметра (0,01 мм), причем каждая десятая линия сделана длиннее промежуточных, чтобы облегчить подсчет; и по этим выгравированным линиям оценивается измерение в каждом конкретном случае. Поверх весов закреплено защитное стекло, защищающее их от травм.

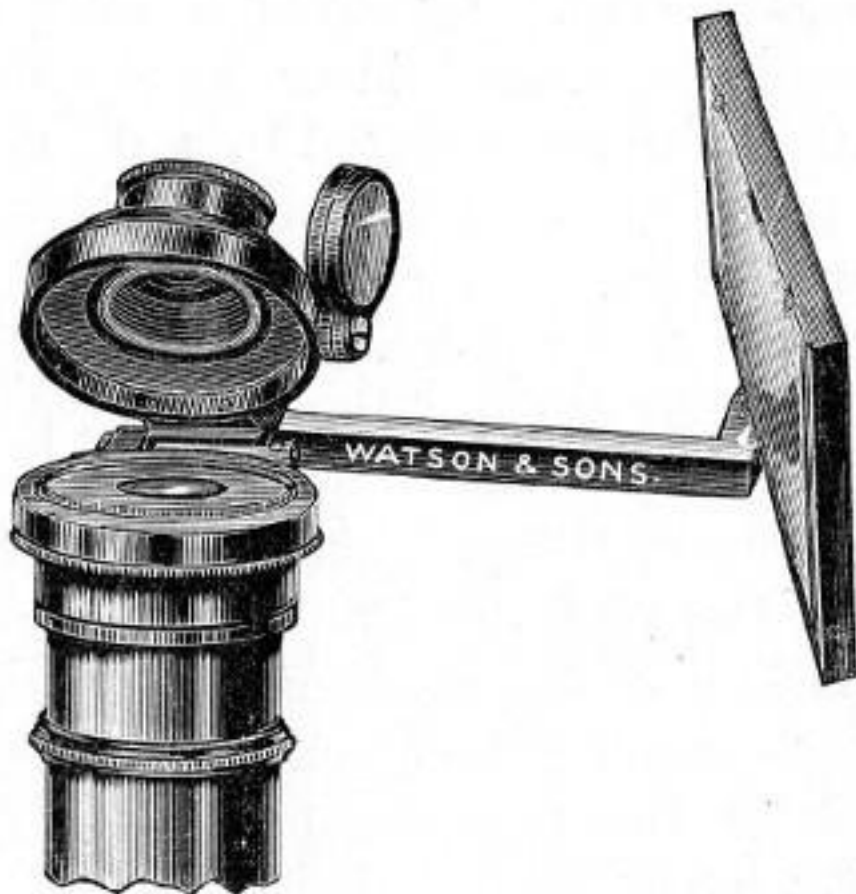


Рис. 55.—Люцида камеры,

рисунок Аббе.

(а) С помощью камеры Lucida.

1. Прикрепите камеру lucida (по образцу Волластона, Била или Аббе) (рис. 55) к окуляру микроскопа.
2. Отрегулируйте микрометр на подложке микроскопа и точно сфокусируйте деления.
3. Перенесите шкалу сценического микрометра на лист бумаги и сделайте ручкой или карандашом набросок увеличенного изображения, каждое деление которого соответствует 10 мкм. Отметьте на бумаге оптическую комбинацию (окулярный объектив и длину трубки), используемую для получения данного конкретного увеличения.

4. Повторите эту процедуру для каждой из возможных комбинаций окуляров и объективов, установленных в поставляемом микроскопе, и тщательно сохраняйте полученные таким образом шкалы.

Чтобы измерить объект с помощью этого метода, просто спроецируйте изображение в масштабе, соответствующем конкретной оптической комбинации, используемой в данный момент. Посчитайте количество делений, которые он занимает, и выразите их как *micra*.

Вместо сохранения шкалы для каждой оптической комбинации объект, подлежащий измерению, и шкала микрометра могут быть спроецированы и зарисованы по очереди на одном и том же листе бумаги с особым вниманием к тому, чтобы центр окуляра находился на расстоянии 25 см от бумаги, на которой нанесены деления.



Рис. 56.—Окуляр микрометра, обыкновенный.

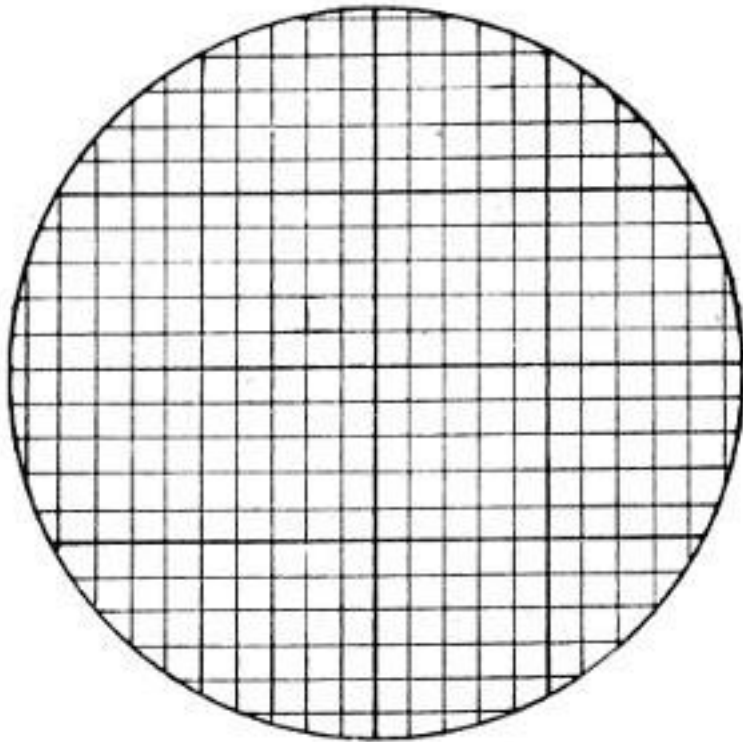


Рис. 57.Окулярный микрометр, сетка.

(b) С помощью окулярного микрометра.

The **Окулярный микрометр** представляет собой круглый стеклянный диск с выгравированной на нем шкалой, разделенной на десятые доли миллиметра (0,1 мм) (рис. 56), или всей поверхностью, размеченной на квадраты толщиной 0,1 мм (чистый микрометр) (рис. 57). Он может быть установлен внутри крепления любого окуляра чуть выше отверстия диафрагмы и должен быть отрегулирован точно в фокусе глазной линзы.

Некоторые производители монтируют стеклянный диск вместе с круглым защитным стеклом таким образом, что при установке в любой гюйгеновский окуляр их собственного производства шкала находится в точном фокусе для нормального зрения. Также доступны специальные окуляры с регулировкой наклона линзы для фокусировки микрометра.

Сначала необходимо определить значение одного деления шкалы микрометра для каждой оптической комбинации с помощью микрометра stage, таким образом:

1. Вставьте окулярный микрометр внутрь окуляра и отрегулируйте положение микрометра на подступенке микроскопа.
2. Точно сфокусируйте шкалу сценического микрометра; линии будут казаться расположенными непосредственно под линиями окулярного микрометра. Сделайте линии на двух микрометрах параллельными, вращая окуляр.
3. Сделайте так, чтобы две линии на окулярном микрометре совпали с линиями, ограничивающими одно деление сценического микрометра; это достигается путем увеличения или уменьшения длины трубки; и запишите количество включенных делений.

4. Рассчитайте значение каждого деления окулярного микрометра в единицах μ с помощью следующей формулы:

$$x = 10 y.$$

Где x = количество включенных делений окулярного микрометра.

y = количество включенных делений ступенчатого микрометра.

5. Запишите оптическую комбинацию, использованную в этом эксперименте, и запишите ее с помощью рассчитанного значения микрометра.

Повторите этот процесс для каждой из остальных комбинаций. Тщательно запишите результаты.

Чтобы измерить объект с помощью этого метода, считайте количество делений микрометра окуляра, которое он занимает, и выражайте результат в *микрах* со ссылкой на стандартное значение для конкретной используемой оптической комбинации.

Цейсс готовит микрометр с компенсирующим окуляром для использования со своими апохроматическими объективами, деления которых рассчитаны таким образом, что (при длине трубки 160 мм) значение каждого из них эквивалентно количеству *микр*, равному миллиметрам фокусного расстояния используемого объектива.

Эйконометр Райта на самом деле представляет собой модификацию окулярного микрометра для быстрого измерения микроскопических объектов путем непосредственного осмотра с предварительным определением увеличительной мощности конкретной используемой оптической комбинации. Это небольшой прибор, напоминающий окуляр, со скользящей линзой, которую можно точно сфокусировать по микрометровой шкале, закрепленной внутри прибора. При размещении над окуляром микроскопа деления этой шкалы измеряют фактический размер виртуального изображения в миллиметрах.

Чтобы использовать этот прибор для прямых измерений, сначала необходимо определить увеличительную силу каждой комбинации окуляра, длины трубки и объектива.

Поместите микрометр, разделенный на сотые доли миллиметра, на подставку микроскопа и точно сфокусируйте.

Приложите эйконометр к окуляру. Наблюдение через эйконометр показывает его микрометрическую шкалу, наложенную на изображение сценического микрометра.

Поворачивайте эйконометр до тех пор, пока линии на двух шкалах не станут параллельными, и выполняйте различные регулировки, чтобы убедиться, что две линии на шкале эйконометра совпадают с двумя линиями на сценическом микрометре.

Для иллюстрации можно предположить, что пять делений на сценическом микрометре точно заполняют одно из делений шкалы эйконометра; это указывает на увеличительную силу 500 как

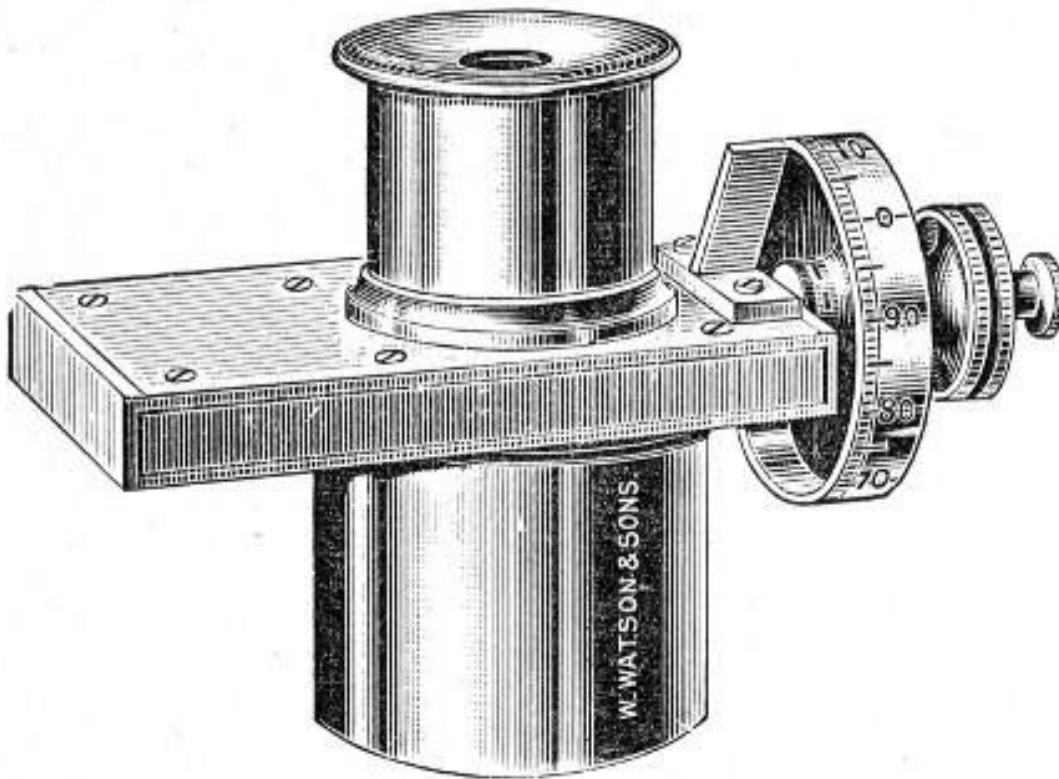
постоянную для данной конкретной оптической комбинации, и этот факт следует зафиксировать.

Аналогичным образом должны быть рассчитаны и зарегистрированы константы увеличения различных других оптических комбинаций.

Чтобы впоследствии измерить какой-либо объект, его следует сначала тщательно сфокусировать обычным способом.

Затем следует приложить эйконометр к окуляру и отсчитать размер объекта по шкале эйконометра в миллиметрах, а фактический размер вычислить путем деления наблюдаемого размера на постоянную увеличения для конкретной оптической комбинации, используемой при наблюдении.

(с) С помощью филиарного микрометра.



микрометр Рамсдена.

Рис. 58.Филирный

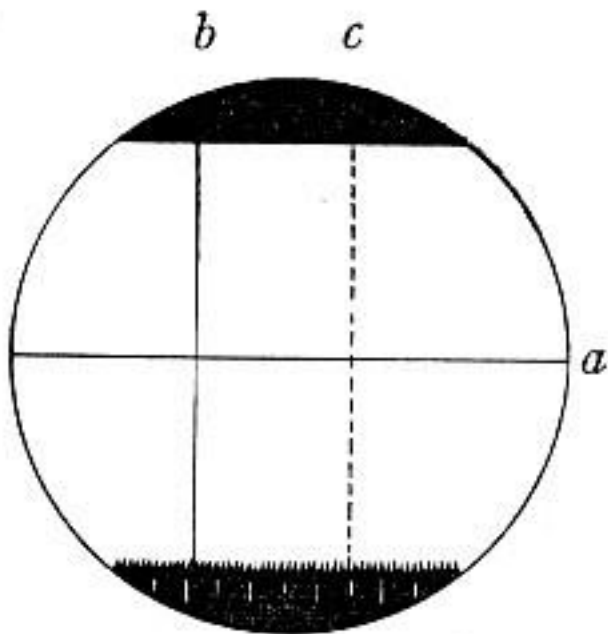


Рис. 59. Поле микromетра Рамсдена, а — неподвижный провод; б - контрольный провод (неподвижный); в- подвижный провод.

Окуляр **филярного** или паутинного микromетра (микromетр Рамсдена) (рис. 58) состоит из окуляра, имеющего тонкую "неподвижную" проволоку, протянутую горизонтально поперек поля (рис. 59), вертикальную контрольную проволоку—неподвижную, отрегулированную под прямым углом к первой; и тонкую проволоку, параллельную контрольной проволоке, которую можно перемещать по полю с помощью микromетрического винта; головка барабана разделена на сто частей, которые последовательно проходят фиксированный указатель при повороте головки. В нижней части поля расположена гребенка, промежутки между зубьями которой соответствуют одному полному обороту этой головки винта.

Как и в предыдущем методе, сначала необходимо определить значение каждого деления микromетрической шкалы (*т.е.* гребенки) для каждой оптической комбинации. Это осуществляется следующим образом:

1. Установите филярный микromетр и ступенчатый микromетр в соответствующие положения.
2. Вращайте винт филярного микromетра до тех пор, пока подвижная проволока не совпадет с неподвижной, а указатель не отметит ноль на головке барабана. (Если при нулевом положении головки барабана два провода не совпадают точно, их необходимо отрегулировать, ослабив винт барабана и переустановив барабан.)
3. Точно сфокусируйте шкалу каждого микromетра и сделайте линии на них параллельными.
4. Вращайте головку микromетрического винта до тех пор, пока подвижная линия не пересечет одно деление ступенчатого микromетра. Запишите количество полных оборотов (с помощью регистрирующей гребенки) и доли оборота (с помощью шкалы на головке микromетрического винта), которые требуются для измерения 0,01 мм.
5. Проведите несколько таких оценок и усредните результаты.

6. Обратите внимание на оптическую комбинацию, использованную в этом эксперименте, и тщательно запишите ее вместе с микрометрическим значением в единицах μ .

7. Повторите этот процесс для каждой из различных оптических комбинаций и запишите результаты.

Чтобы измерить объект с помощью этого метода, просто запишите количество оборотов и долей оборота головки винта, необходимых для перемещения такого объекта от края до края, и выразите результат в виде *micra* со ссылкой на зарегистрированные значения для этой конкретной оптической комбинации.

Источник света для микроскопа.—В тропических и субтропических регионах лучшим источником света является рассеянный дневной свет. Однако в умеренном климате дневной свет в желаемом количестве не всегда доступен, и приходится прибегать к керосиновым лампам, газовым фонарям — предпочтительно с плафонами накаливания — и электричеству; и из них последнее, несомненно, является лучшим. Удобный держатель лампы, который можно изготовить в лаборатории, показан на рис. 60. Он состоит из базовой доски, утяжеленной свинцом, к которой прикреплен обычный бытовой держатель лампы, а сзади к нему прикреплен изогнутый отражатель из листового железа. Металлическая лампа накаливания с затемнением мощностью около 16 свечей дает наиболее подходящий свет, и, если требуется монохроматический свет, синий жирный карандаш наносится на сторону лампы, ближайшую к микроскопу; включается ток, и когда стеклянная колба нагреется, протираание ватным тампоном позволяет равномерно распределить синий жирный материал по матовому стеклу.

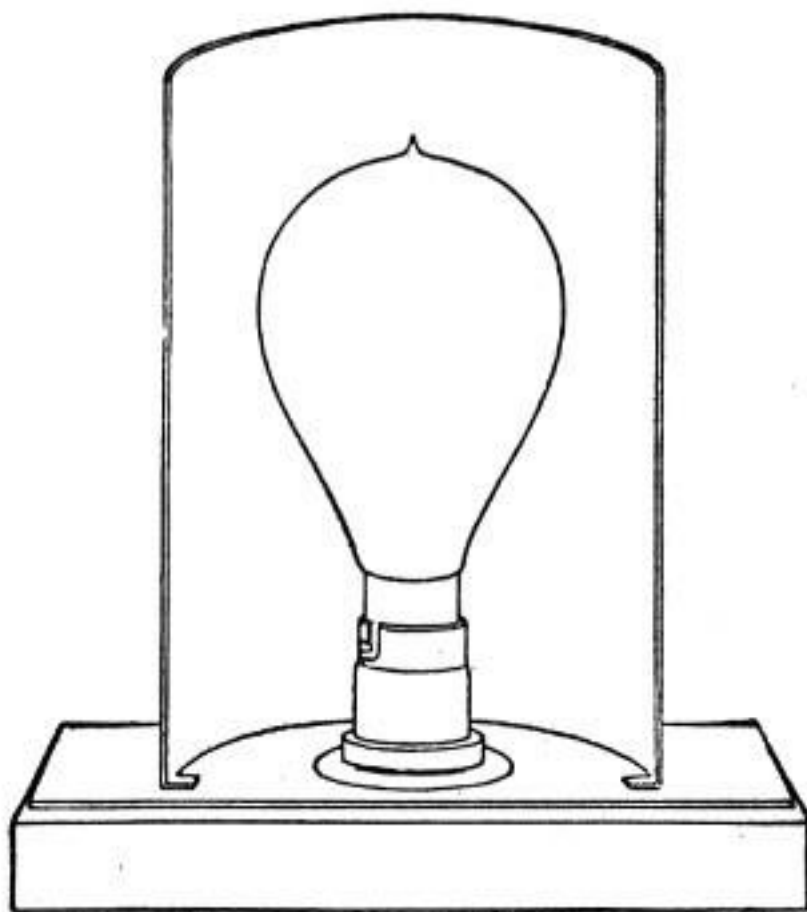


Рис. 60. Лампа для

электрического микроскопа.

СНОСКИ:

[1] Однако его важность будет осознана, когда будет изложена словами покойного профессора Аббе: "Числовая апертура объектива определяет все его существенные качества; яркость изображения увеличивается при заданном увеличении и при прочих равных условиях, как квадрат апертуры; разрешающая и определяющая способности напрямую связаны с этим, фокусная глубина дифференциации глубин изменяется обратно пропорционально размеру объектива". отверстие и так далее".

[2] Сделано мистером Отто Баумбахом, 10, Лайм-Гроув, Манчестер.

V. МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЙ И ДРУГИХ МИКРОМИЦЕТОВ.

ПРИБОРЫ И РЕАГЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ОБЫЧНОМ МИКРОСКОПИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ.

Ниже приведены необходимые приборы и реагенты для обычной работы, которыми должен быть обеспечен каждый студент.

1. Индия - резиновый "коврик для переодевания", на который можно класть защитные очки в процессе окрашивания.
2. Квадраты промокательной бумаги около 10 см., для сушки титульных листов и предметных стекол.

(Фильтровальная бумага, известная как "немецкая подкладка" — бумага с высокой впитывающей способностью, плотно сплетенная, имеющая ровную поверхность и не прилипающая к образцам "пушинка", — наиболее полезна для этой цели.)

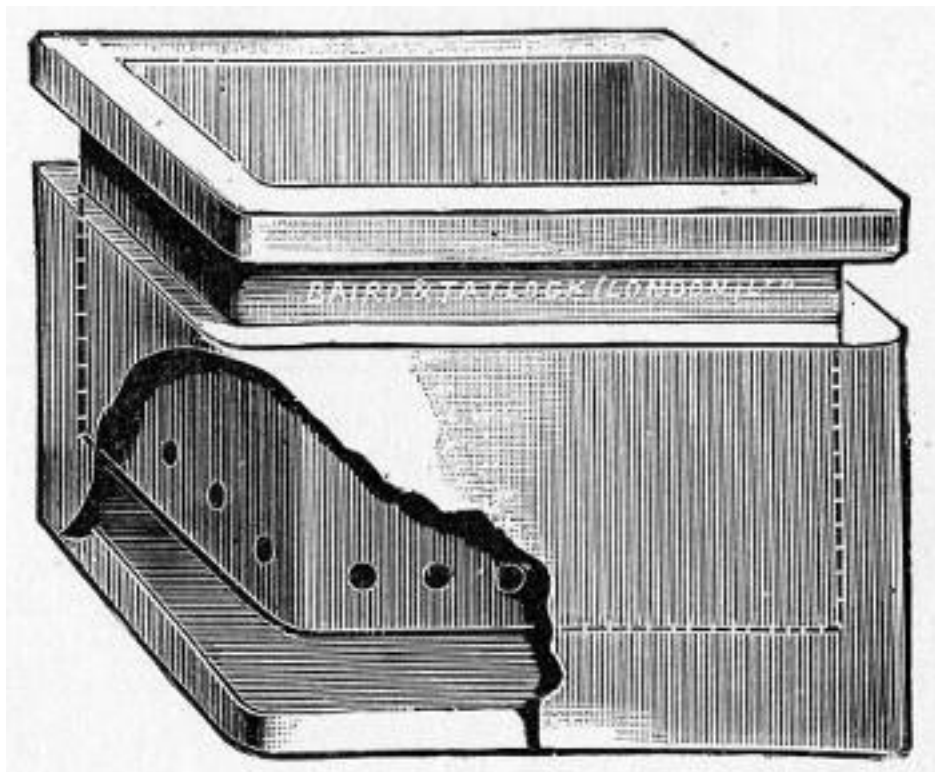


Рис. 61. Банка для

дезинфицирующего средства.

3. Стеклобанка, заполненная 2-процентным раствором. раствор лизола для приема инфицированных в защитных стаканах и инфицированных пипетках и т.д.
4. Квадратная глазурованная фаянсовая коробка с неплотной подкладкой, содержащая 2%-ный раствор лизола. раствор лизола для приема инфицированного материала и использованных предметных стекол. Нижняя часть подкладки перфорирована, чтобы при заполнении подкладку и ее содержимое можно было целиком извлечь из коробки, когда дезинфицирующий раствор

стечет, а предметные стекла и т.д. Можно будет легко вынуть. Затем пустую прокладку возвращают в коробку с дезинфицирующим раствором (рис. 61).

5. Горелка Бунзена, снабженная байпасом "реер-flame".

6. Фарфоровый желоб с пятью или шестью подвесными горками (рис. 62).

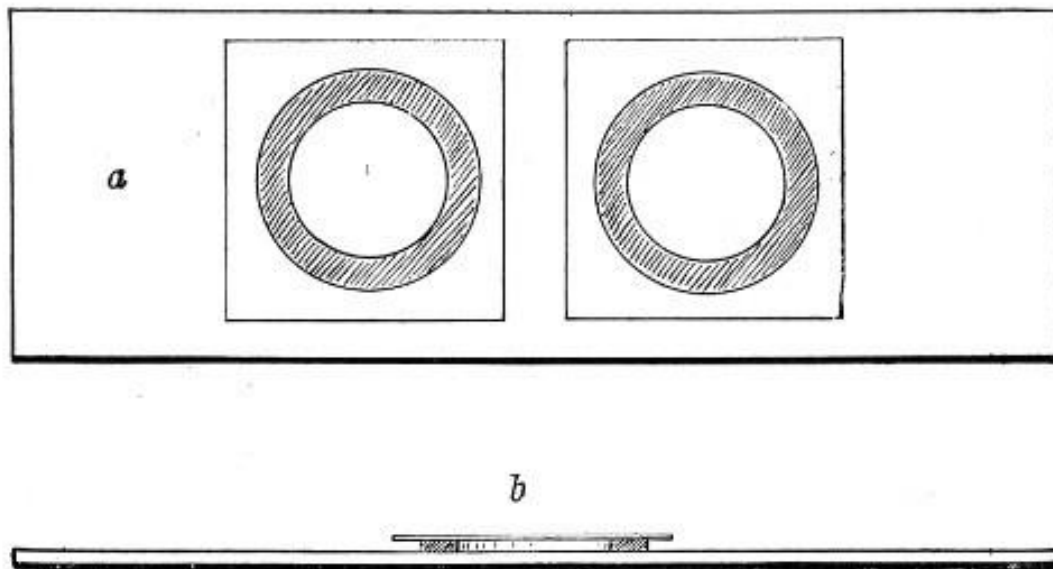


Рис. 62.

Предметные стекла для подвешивания: а, двойная ячейка, видимая сверху; б, одиночная ячейка, видимая сбоку.

Лучшая форма предметного стекла для подвешивания - это модификация стеклянного кольцевого предметного стекла Бетчера, которое изготавливается путем цементирования круглой ячейки из олова диаметром от 13 до 15 мм и толщиной от 1 до 2 мм. по высоте до центра 3 на 1 смажьте с помощью канадского бальзама. Часто бывает чрезвычайно удобно, когда две из этих ячеек склеены близко друг к другу на одном предметном стекле (рис. 62, а).

Изготавливается другая форма подвесных слайдов, в которой из центра слайда размером 3 на 1 выточена круглая или овальная вогнутость или "ячейка". Они более дорогие, с ними менее удобно работать, и они легче загрязняются каплями исследуемого материала, поэтому их следует тщательно избегать.

7. Три алюминиевых стержня (рис. 63), каждый длиной около 25 см, с куском платино-иридиевой проволоки 0,015 калибра длиной 7,5 см. Конец одной из проволоки загибают в круговую, образуя овальную петлю длиной около 1 мм. имеет небольшой диаметр и называется петлей или стержнем; вывод 3 или 4 мм. другой проволоки расплющивают, ударяя молотком по гладкой железной поверхности, образуя "лопаточку"; третью оставляют нетронутой или заостряют с помощью напильника. Эти инструменты используются для инокуляции культуральных пробирок и подготовки образцов для микроскопического исследования.

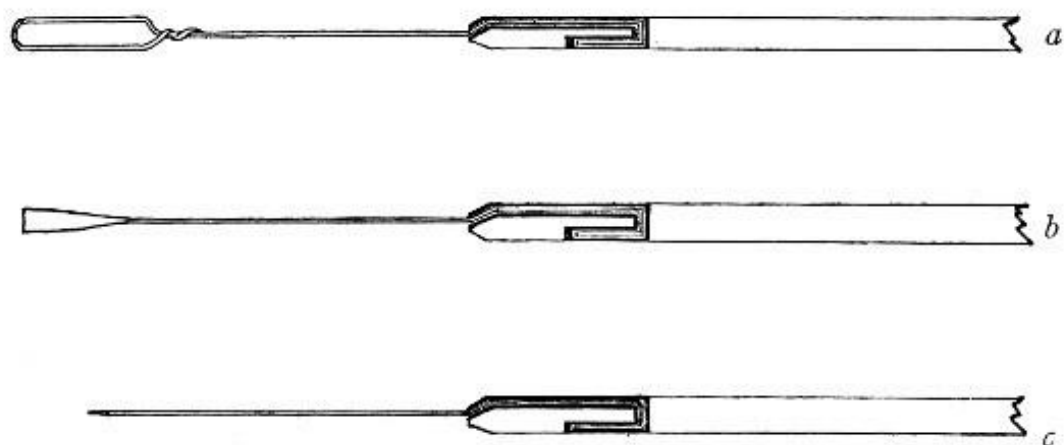


Рис. 63. Концы

платиновых стержней. а — петля; б - лопаточка; в - игла.

Способ монтажа этих проводов может быть описан следующим образом:

Возьмите кусок алюминиевой проволоки длиной 25 см и диаметром около 0,25 см и просверлите тонкое отверстие насквозь в проволоке примерно в сантиметре от одного конца. Прodelайте прямой узкий канал вдоль одной стороны проволоки, по ее длинной оси, от отверстия до ближайшего конца, сначала неглубокий, но постепенно становящийся глубже.

На противоположной стороне проволоки сделайте короткий надрез длиной 2 мм. ведущий от отверстия в том же направлении. [Использование тонкой стоматологической бормашины и небольшой циркулярной пилы, приводимой в действие зубо врачебным мотором, облегчает изготовление этих инструментов с алюминиевыми ручками.]

Теперь пропустите один конец платиновой проволоки через отверстие, загните примерно на 2 мм. под прямым углом и вдавите короткий отрезок в короткий вырез. Резко поверните длинный конец проволоки, также под прямым углом, и вставьте его в длинный канал так, чтобы он выходил примерно из центра обрезанного конца алюминиевой проволоки (рис. 63). Теперь несколько резких нажатий молотком часового мастера сомкнут два канала по бокам провода и надежно удержат его.

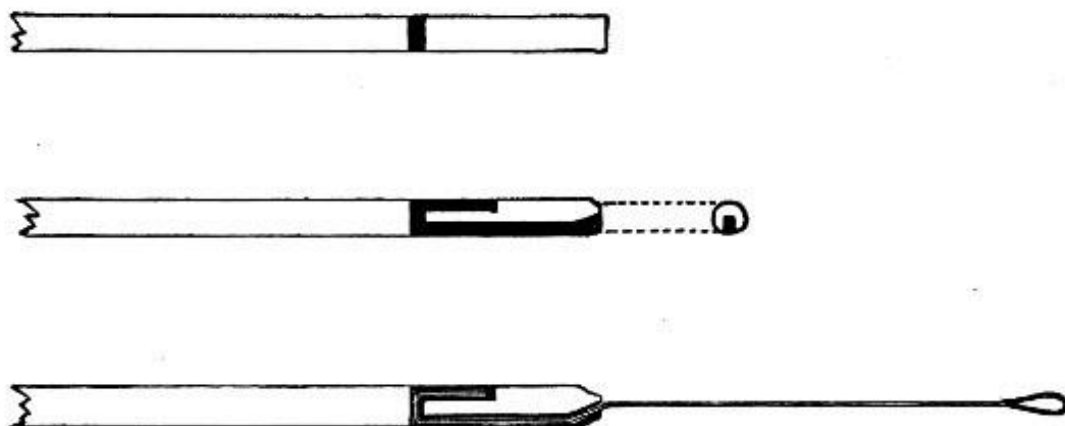


Рис. 64.—

Платиновый стержень в алюминиевой ручке—способ крепления. Платиновую проволоку можно

вплавить в конец стеклянного стержня, но такая ручка значительно уступает алюминиевой и не рекомендуется.

8. Две пары остроконечных пружинных щипцов (длиной 10 см), одна из которых должна содержаться в идеальной чистоте и предназначаться для работы с чистыми обложками, а другая - для использования при окрашивании.

9. Коробка чистых стеклянных пластинок размером 3 на 1.

10. Стеклянная капсула с плотно прилегающей (притертой) стеклянной крышкой, содержащая чистые покровные листы в абсолютном спирте.

11. Один из "жирных карандашей" Фабера (желтый, красный или синий) для письма на стекле.

12. Деревянная подставка (рис. 65) с двенадцатью бутылками (рис. 66) емкостью 60 г каждая, содержащая

Анилиновая вода.

Горечавка фиолетовая, насыщенный спиртовой раствор.

Йод Люголя (грамм).

Абсолютный алкоголь.

Метиленовый синий, }
Фуксин основной, } насыщенный спиртовой раствор.

Нейтрально-красный, 1%. водный раствор.

Модифицированная краска Лейшмана по Романовски.

Карболовая кислота, 5%. водный раствор.

Уксусная кислота, 1%. раствор.

Серная кислота, 25%. раствор.

Ксилол.



Рис. 65.—

Подставка для окрашивания, резиновый коврик для переодевания и емкость с лизолом.

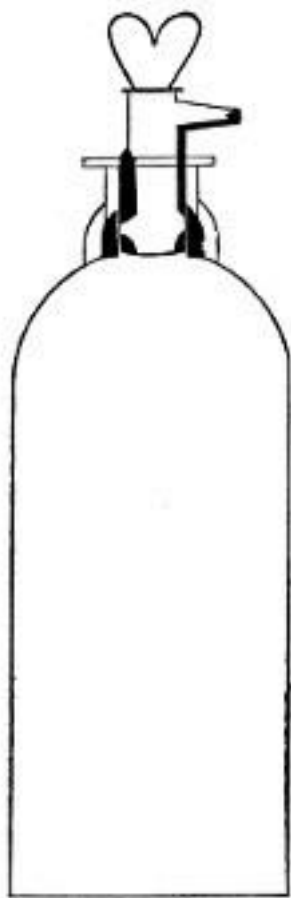


Рис. 66.—Бутылочка для капель.

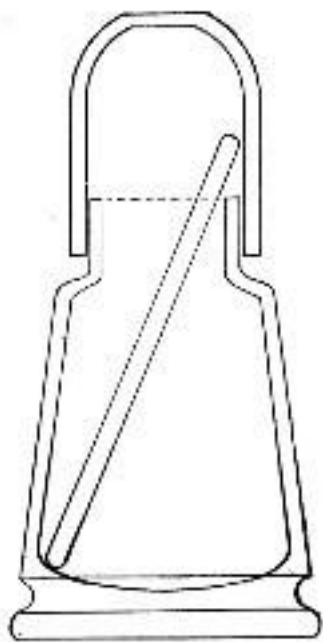


Рис. 67.—Горшочек с канадским бальзамом.

И две емкости с герметичными стеклянными крышками (рис. 67), каждая снабжена стеклянной палочкой и наполнена соответственно канадским бальзамом, растворенным в ксилоле, и стерильным вазелином.

МЕТОДЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ.

Бактерии и т.д. исследуются микроскопически.

1. В живом состоянии, без пятен.
2. В "исправленном" состоянии (*т. е.* зафиксирован, уничтожен и окрашен подходящими методами).

Подготовка образца из пробирки для исследования с помощью этих методов может быть описана следующим образом:

1. Живой, Незапятнанный.—(а) "Свежий" препарат.—

1. Очистите и высушите стеклянную пластинку размером 3 на 1 и положите ее на один из квадратов фильтровальной бумаги. Добавьте каплю воды (предпочтительно дистиллированной) или 1-процентную. раствор едкого калия наносится по центру пластины с помощью платиновой петли.

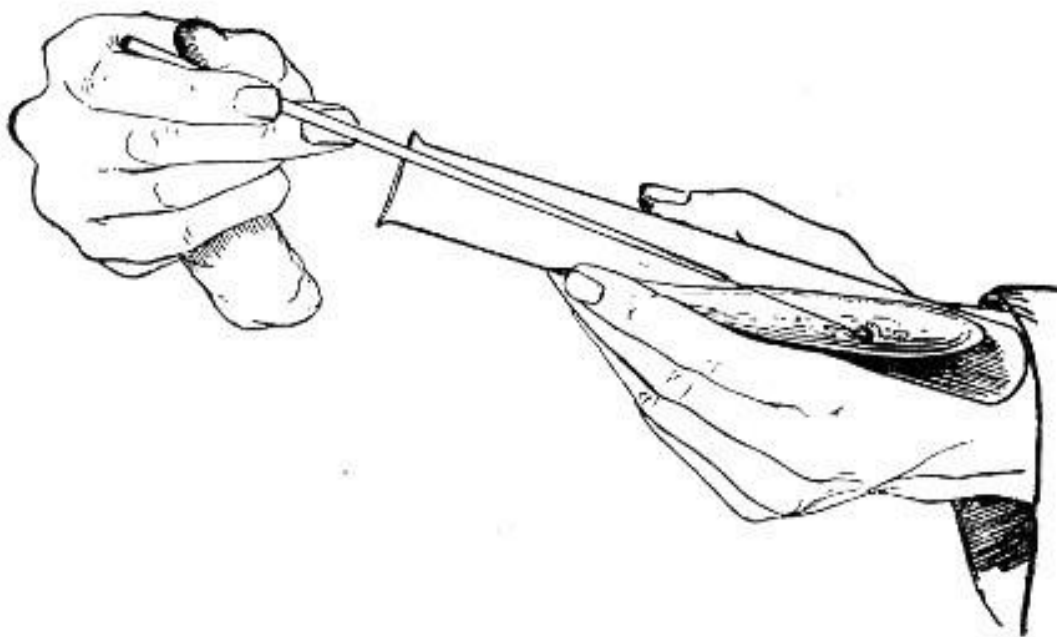


Рис. 68. Пробирки

для удаления размножения бактерий, если смотреть спереди.

Техника вскрытия и закрытия культуральной пробирки.

2. Снимите пробирку с подставки или банки левой рукой и поднесите ватную пробку к пламени горелки Бунзена. Погасите пламя, подув на пробку, одновременно вращая пробирку вокруг своей длинной оси так, чтобы ее горловина была направлена вертикально вверх, между большим и указательным пальцами. (Эта операция называется "выжигание пробки" и предназначена для уничтожения любых микроорганизмов, которые могли запутаться в рыхлых волокнах ваты и которые, если их не уничтожить таким образом, могут попасть в пробирку при извлечении пробки и таким образом случайно загрязнить культивирование.)

3. Держите пробирку в центре или около него между концами большого и двух первых пальцев левой руки и положите запечатанный конец на тыльную сторону ладони между большим и указательным пальцами так, чтобы пробка была направлена вправо. Держите пробирку как можно ближе к горизонтальному положению, насколько это соответствует технике безопасности, чтобы уменьшить риск случайного попадания организмов (рис. 68).

4. Возьмите ручку петли между большим и указательным пальцами правой руки, удерживая инструмент в положении, аналогичном положению ручки или кисточки для рисования, и стерилизуйте платиновую часть, подержав ее в пламени горелки Бунзена, пока она не раскалится докрасна. Простерилизуйте прилегающую часть алюминиевой ручки, быстро пропустив ее два или три раза через пламя. После стерилизации петле нельзя позволять покидать руку или прикасаться к чему-либо, кроме материала, который она предназначена для исследования, до тех пор, пока с ней не будет покончено и она не будет снова стерилизована.

5. Жажмите ватную пробку пробирки между мизинцем и ладонью правой руки (все еще удерживая петлю, как указано в шаге 4) и извлеките ее из горлышка пробирки "завинчивающим" движением правой руки.

6. Вставьте платиновую петлю в пробирку и удерживайте ее в таком положении до тех пор, пока она не остынет. (Охлаждение можно ускорить, прикоснувшись к петельке на одной из капель влаги, которые обычно конденсируются на внутренней поверхности стеклянной пробирки, или окунув ее в конденсат на дне; в то же время при выращивании культур на твердых средах необходимо соблюдать осторожность, чтобы не коснуться ни среды, ни ростков.)

7. Удалите небольшую часть ростка, набрав каплю жидкости, в случае жидкой культуры, в петлю; или прикоснувшись к петле на поверхности ростка, когда культура находится на твердой среде; и извлеките петлю из пробирки, больше не прикасаясь к среде или стеклянным стенкам пробирки.

8. Вставьте ватную пробку в горловину трубки.

9. Установите тюрбик для выращивания в подставку или банку.

10. Тщательно перемешайте содержимое петли с каплей воды с горкой размером 3 на 1.

11. Снова простерилизуйте петлю, как указано в шаге 4, и установите ее на подставку.

12. Снимите покровную накладку со стеклянной капсулы с помощью щипцов, подержите ее на мгновение на краю, на листе фильтровальной бумаги, чтобы удалить излишки спирта, затем пропустите ее через пламя горелки Бунзена. При этом сгорает остаток спирта, и "обожженная" покровная накладка теперь чистая, сухая и стерильная.

13. Осторожно и аккуратно опустите накладку, все еще удерживаемую пинцетом, на поверхность капли жидкости на накладке размером 3 на 1, чтобы избежать попадания пузырьков воздуха.

14. Исследуйте под микроскопом (*смотрите инфракрасное изображение*).

Во время микроскопического исследования пятна и другие реагенты могут быть нанесены под покровное стекло простым методом: капля реагента попадает на один край покровного стекла, а оторванный край листа промокательной бумаги прикладывается к противоположной стороне. Затем можно наблюдать, как реагент течет по полю и вступает в контакт с теми микроорганизмами, которые встречаются на его пути.

Нетоксичными основными красителями, наиболее широко используемыми для внутривенного окрашивания бактерий, являются

Нейтральный красный, } в 0,5%-ном растворе. водные растворы.

Хинолеиновый синий }

Метиленовый зеленый }

Везувин, }

Отрицательное пятно (Бурри).—С помощью этого метода демонстрации точно моделируются явления, возникающие при освещении темного грунта (с помощью параболического конденсатора), поскольку мельчайшие частицы, бактерии, клетки крови или гноя и т.д. Выделяются в виде ярко-белых или бесцветных тел на темном серо-коричневом фоне.

Требуемый реагент:

Любые жидкие водостойкие черные чернила для рисования (Чин-чин, Пеликан и т.д.). Их готовят к использованию следующим образом:

Отмерьте и смешайте:

Жидкие черные чернила,	Настойка йода
25 гр.	1 гр.

Дайте смеси настояться 24 часа, тщательно центрифугируйте, перелейте надосадочную жидкость пипеткой в чистую бутылку и затем добавьте кристаллик тимола или одну каплю формалина в качестве консерванта.

Способ.—

1. Стерилизованной петлей нанесите одну каплю жидких чернил на один конец предметного стекла размером 3 на 1.
2. С помощью стерилизованной петли нанесите каплю жидкой культуры (или эмульсии из твердой культуры) рядом с каплей чернил (рис. 69, а); тщательно перемешайте две капли с помощью петли.
3. Простерилизуйте петлю.
4. Крепко держите предметное стекло на скамье, приложив большой и указательный пальцы левой руки к концу, ближайшему к капле жидкости.
5. Возьмите в правую руку еще одно чистое предметное стекло размером 3 на 1 и опустите его короткий конец наискось (под углом около 60 °) поперек смешанной краски и культуры на первом предметном стекле и дайте жидкости растечься по предметному стеклу и заполнить угол падения.
6. Сохраняя первоначальный угол наклона, прочно и равномерно проведите второй слайд вдоль первого к концу, наиболее удаленному от левой руки (рис. 69, б).
7. Бросьте вторую горку в емкость с дезинфицирующим средством; дайте первой горке высохнуть на воздухе.

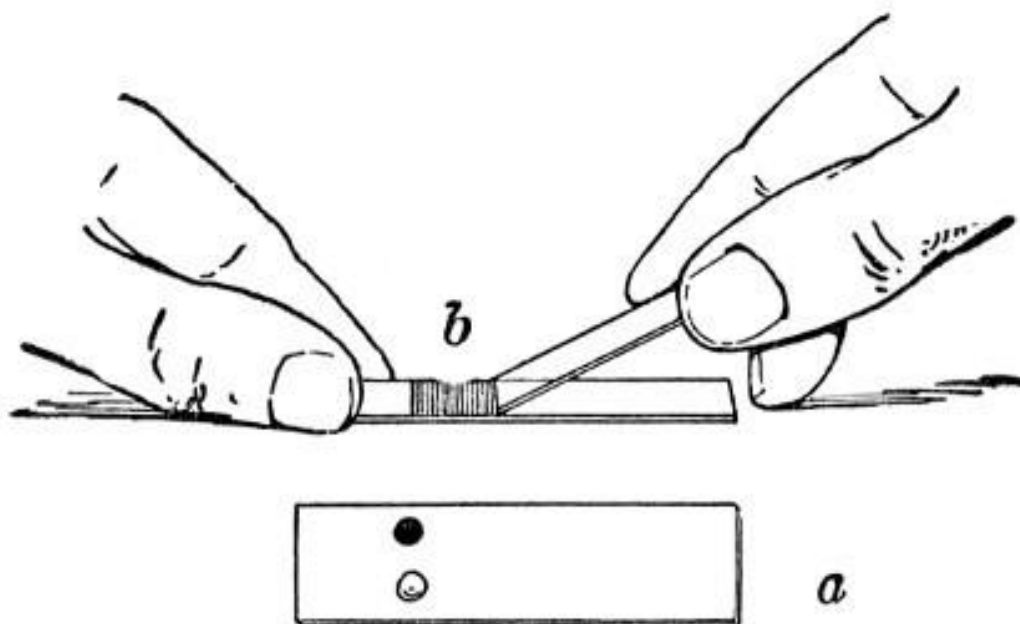


Рис.

69. Растекающаяся негативная пленка.

8. Нанесите каплю иммерсионного масла в центр пленки, опустите объектив диаметром 1/12 дюйма в масло и исследуйте под микроскопом, не используя защитную накладку.

(Слой чернил можно покрыть длинным покровным стеклом и ксилоловым бальзамом в качестве постоянного средства.)

б) Подготовка к подвешиванию. -

1. Нанесите слой стерильного вазелина на верхнюю поверхность кольцевой ячейки предметного стекла с помощью стеклянной палочки, входящей в комплект флакона с вазелином, и поместите предметное стекло на лист фильтровальной бумаги.

2. "Сожгите" защитную полоску и положите ее на фильтровальную бумагу сбоку от предметного стекла.

3. Нанесите каплю воды на центр накладной пластины с помощью платиновой петли.

4. Возьмите небольшое количество материала, который требуется исследовать, способом, описанным выше (страницы 74-76, шаги 2-11 должны выполняться полностью и со строжайшей точностью при каждом обращении с содержимым пробирки), и смешайте его с каплей воды на покровном листе.

5. Приподнимите накладку за кончики щипцов и быстро переверните ее на кольцевую ячейку предметного стекла для подвешивания так, чтобы капля жидкости заняла центр кольца. (Тщательно избегайте контакта капли жидкости либо с кольцевой ячейкой, либо со слоем вазелина. Если это произойдет, то теперь *зараженный* предметный предмет для подвешивания и его покровную накладку необходимо опустить в емкость с лизолом и приготовить новый препарат.)

6. Плотно прижмите накладку к вазелину в верхней части кольцевой ячейки. (Это распределяет вазелин тонким слоем и, помимо обеспечения адгезии покровного слоя, уплотняет клетки и, таким образом, замедляет испарение.)

7. Исследуйте под микроскопом.

Исследование "свежего" образца или препарата "в подвешенном состоянии" направлено на определение следующих данных:

1. Природа присутствующих бактерий —*например*, кокки, бациллы и т.д.
2. Чистота культивирования; это может быть определено только при наличии серьезных морфологических различий между присутствующими организмами.
3. Наличие или отсутствие спор; при наличии споры чрезвычайно хорошо демонстрируют свою типичную преломляемость с помощью этого метода.

4. Наличие или отсутствие подвижности. В висячем образце практически всегда можно наблюдать какую-либо форму движения, и его характер должен быть тщательно определен путем наблюдения за относительным расположением соседних микроорганизмов.

(а) Броуновское или молекулярное движение. Мельчайшие частицы твердого вещества (включая бактерии), взвешенные в жидкости, всегда будут демонстрировать вибрационное движение, влияющее на все поле, но никогда не изменяющее относительного положения бактерий. (Кокки демонстрируют это движение, но, за исключением *Micrococcus agilis*, кокки неподвижны.)

(b) Потокное движение. Это происходит из-за течений, возникающих в висящей капле в результате сотрясения образца или испарения, или из-за того факта, что покровное покрытие не является идеально ровным, и хотя относительное расположение бактерий может варьироваться, все же плавного движения большого количества организмов в каком-то одном направлении обычно будет достаточно, чтобы продемонстрировать природу этого движения.

(с) локомотивное движение, или **истинная подвижность**, определяется путем наблюдения за какой-либо конкретной бациллой, изменяющей свое положение в поле независимо от других присутствующих организмов и в противоположном им направлении.

Когда исследование завершено и с образцом покончено, "свежий образец" —*т.е.* предметное стекло с прикрепленной к нему защитной накладкой — необходимо опустить в емкость с лизолом. Однако в образце для подвешивания инфицирована только покровная накладка, которую можно извлечь из кольцевой ячейки с помощью щипцов и опустить в дезинфицирующее средство.

Постоянное окрашивание образца для подвешивания.—Иногда необходимо закрепить и окрасить препарат для подвешивания. Это можно сделать следующим образом:

1. Снимите защитную пленку с ячейки с помощью щипцов.
2. Если капля небольшая, зафиксируйте ее, капнув лицевой стороной вниз, пока она еще влажная, на поверхность какого-нибудь раствора Галланда или агрессивного сублиматного раствора (*видео стр. 82*) в часовом стекле. Если капля большая, положите ее лицевой стороной

вверх на резиновый коврик, накройте перевернутым часовым стеклом и дайте ей высохнуть. Затем закрепите его в спиртово-эфирном растворе (*видео*, стр. 82).

3. Опустите защитное стекло в стакан с горячей водой, чтобы удалить часть прилипшего к нему вазелина.

4. Последовательно промойте в спирте, ксилоле, эфире и спиртовом спирте, чтобы удалить последние следы жира.

5. Промойте в воде.

6. Нанесите пятно, вымойте, высушите и смонтируйте, как при приготовлении обычной покровной пленки (*видео*, стр. 83-85).

2. Убит, окрашен.—В этом методе необходимы три отдельных процесса:

"Подготовка" и "закрепление" пленки.

Окрашивание.

Монтаж.

Готовлю фильм.—

1. Сожгите защитную пленку и положите ее на лист фильтровальной бумаги.

2. Нанесите каплю воды на центр накладки с помощью платиновой петли.

3. Нанесите небольшое количество исследуемого материала на стерилизованную платиновую петлю (см. страницы 74-76, шаги 2-11) и смешайте его с каплями воды на покровном листе.

4. Равномерно распределите каплю эмульсии по покровному листу в виде квадратной пленки с точностью до 1 мм. от каждого края покровного листа.

5. Дайте ему полностью высохнуть на воздухе.

Крепление.—Закрепите, пропустив накладку, зажатую в пальцах, три или четыре раза через пламя горелки Бунзена.

В некоторых случаях (*например*, когда пленки после окрашивания предназначены для микрометрических наблюдений) практически необходимо закрепить их выдержкой при постоянной температуре 115°C в течение двадцати минут. Лучше всего это готовить в тщательно разогретой духовке с горячим воздухом.

Фиксация также может быть осуществлена путем погружения в какую-либо фиксирующую жидкость, такую как одна из следующих:

1. Абсолютный спирт, в течение пяти-пятнадцати минут.

2. Абсолютный спирт, эфир, равные части, в течение пяти-тридцати минут (*например*, для крови или молока).

3. Осмиевая кислота, 1%. водный раствор, в течение тридцати секунд.

4. Сублимируйте едкий насыщенный водный раствор в течение пяти минут.

5. Коррозийный сублимат (Lang) в течение пяти минут. Этот раствор готовят путем растворения:

Хлорид натрия	0,75 грамма
Гидрарг. перхлорид	12,00 грамма
Уксусной кислоты	5,00 грамма
В дистиллированной воде	при 100,00 °с.

Отфильтровать.

6. Раствор Галланда, в течение пяти минут. Этот раствор готовится путем смешивания:

Абсолютный спирт	25,0 с.с.
Эфир	25,0 с.с.
Едкий сублимат, 20%. спиртовой раствор	0,4 с.с.

7. Формалин 10%. водный раствор (= 4%. водный раствор формальдегида, поскольку формалин составляет 40%. растворение газа в воде).

Любой из этих методов фиксации коагулирует белковый материал и обеспечивает идеальную адгезию пленки к покровному листу.

Очистка.—Тщательно промойте накладку в проточной воде и приступайте к окрашиванию.

Если пленка была приготовлена из бульона, разжиженного желатина, гноя или других болезненных выделений, после фиксации пропитайте пленку 2%-ной уксусной кислотой. и дайте ему подействовать в течение двух минут.

Промойте спиртом, затем оставьте спирт на маске в течение двух минут. (Это "очистит" основу и даст гораздо более четкую и чистую пленку, чем можно было бы получить в противном случае.)

Если пленка была получена из крови или окрашенной кровью жидкости, обработайте 2%-ной уксусной кислотой. в течение двух минут после фиксации. Промойте водой, высушите и приступайте к окрашиванию. (Это удалит гемоглобин и облегчит исследование.)

Окрашивание.—

1. Положите накладку пленкой вверх на резиновый коврик.

2. С помощью флакона-капельницы нанесите выбранное пятно на пленочную сторону обложки, дайте ему подействовать в течение нескольких минут, затем смойте излишки проточной водой.

Проникающую способность красителей увеличивают (а) физическими средствами — например, нагреванием красителя; (б) химическими средствами — например, добавлением 5% карболовой кислоты. водный раствор; едкие щелочи, 2%. водные растворы; вода, насыщенная анилиновым маслом; бура, 0,5%. водный раствор.

Наиболее часто используемыми красителями для изготовления защитных пленок являются анилиновые красители.

(А) Основные:

- (a) Метиленовый синий.
- (b) Горечавка фиолетовая.
- (c) Фуксин.

Эти красители выдерживают в насыщенных спиртовых (90%) растворах, чтобы замедлить разложение.

Из двух-трех капель спиртового раствора этих красителей, скажем, при 4°с воды, обычно получается достаточно сильная окрашивающая жидкость для изготовления защитных пленок.

Карболовый метиленовый синий (С.М.В.) и карболфуксин (С.Ф.) получают путем покрытия покровного листа 5%-ным раствором. раствор карболовой кислоты и добавление к нему нескольких капель насыщенного спиртового раствора метиленового синего или фуксина соответственно. Для получения анилиновой горечавки фиолетовой (А.Г.В.) краситель добавляют к насыщенному раствору анилинового масла в воде.

- (d) Тиониновый синий.
 - (e) коричневый Бисмарка.
 - (f) Нейтрально-красный.
- (В) Кислота:
- (a) эозин, водный раствор желтоватого цвета.
 - b) Сафранин.

Эти красители хранятся в 1%. водном растворе, к которому добавляется 5%. спирта в качестве консерванта. Обычно они используются в такой форме.

Иногда используются несколько ядерных красителей (кармин, гематоксилин), особенно при работе с "разрезами".

Обесцвечивание.—После чрезмерного окрашивания пленки могут быть обесцвечены путем промывки в течение более длительного или более короткого времени одним из следующих реагентов, расположенных в порядке возрастания мощности

1. Вода.
2. Хлороформ.
3. Уксусная кислота, 1%.
4. Спирт.
5. Спирт абсолютный, равные части. Уксусная кислота, 1%., соляная кислота, 1%. водный раствор. Соляная, 1%. Спиртовой (90%) раствор.
6. Минеральные кислоты: Серная, 25%. водный раствор. Азотная кислота, 33%. водный раствор.

Встречное окрашивание.—Используйте цвета, которые будут контрастировать с первым пятном; например,,

Везувин, }

Нейтральный красный, } для пленок, окрашенных метиленовым синим или по методу Грэма.
Эозин, }
Фуксин, }

Метиленовый синий, } для пленок, окрашенных фуксином.
Горечавка фиолетовая, }

8. Монтаж.—

1. Тщательно промойте пленку в проточной воде.
2. Промокните излишки воды фильтровальной бумагой или более тщательно высушите между двумя складками промокательной бумаги.
3. Завершите сушку на воздухе или придерживая защитную накладку пальцами на безопасном расстоянии над пламенем горелки Бунзена.
4. Нанесите каплю ксилолового бальзама в центр чистого предметного стекла размером 3 на 1, переверните защитную салфетку на бальзам и осторожно опустите ее, чтобы не допустить попадания пузырьков воздуха.

Примечание.—Ксилол используется предпочтительнее хлороформа для растворения канадского бальзама, поскольку он не обесцвечивает образец.

Оттисковые пленки (*Клатчпрепарат*) получают из изолированных колоний бактерий для того, чтобы их характерное образование можно было исследовать с помощью более высоких технологий, чем те, которые могут быть применены к живому культивированию. Их готовят из пластинчатых сортов (*видео*, стр. 230) следующим образом.

1. Стерильными щипцами снимите чистую крышку со спиртовницы и сожгите спирт.
2. Откройте тарелку и приложите один край покровного листа к поверхности среды немного сбоку от выбранной колонии. Осторожно опускайте его над колонией до горизонтального положения. Избегайте любого бокового перемещения или попадания пузырьков воздуха.
3. Слегка надавите концами пинцета по вертикали на центр накладного листа, чтобы обеспечить идеальный контакт с колонией.
4. Закрепите пинцетом один край покровной пластинки, проведите кончиком установленной иглы чуть ниже противоположного края и осторожно приподнимите покровную пластинку; колония прилипнет к ней. Когда пластина встанет почти вертикально, возьмитесь за накладку щипцами и снимите ее с тарелки. Снова накройте тарелку.
5. Положите накладку пленкой вверх на резиновый коврик и накройте ее перевернутым часовым стеклом до полного высыхания.
6. Закрепите, погрузив в одну из ранее упомянутых фиксирующих жидкостей (*видео*, стр. 82).

7. Очистите уксусной кислотой и спиртом.

8. Нанесите пятно и закрепите как обычную защитную пленку, соблюдая осторожность и выполняя все операции стирки с особой осторожностью.

Микроскопическое исследование неокрашенных образцов.—

1. Установите корпус микроскопа в вертикальное положение.

2. Расположите предметное стекло в виде капли на подставке микроскопа так, чтобы капля жидкости находилась на оптической оси прибора, и закрепите его в этом положении с помощью пружинных зажимов.

3. Используя объектив диаметром 1/6 дюйма, сдвиньте трубку корпуса так, чтобы передняя линза объектива почти соприкасалась с накладкой, то есть находилась на значительном фокусном расстоянии. Лучше всего это делать, наклонив голову в одну сторону от микроскопа, чтобы глаза были на одном уровне с подмостками.

4. Приложите глаз к окуляру и установите плоское зеркало в положение, обеспечивающее наилучшее освещение.

5. Слегка опустите конденсор и уменьшите отверстие ирисовой диафрагмы, чтобы свет был хотя и ровным, но тусклым.

6. Поднимите трубку корпуса с помощью грубой регулировки до тех пор, пока бактерии не станут видны; затем точно сфокусируйте с помощью точной регулировки.

поначалу часто возникают некоторые трудности с поиском свисающей капли, и если первая попытка оказывается неудачной, студент ни в коем случае не должен, все еще прикладывая глаз к окуляру, опускать корпусную трубку (поскольку при этом есть большая вероятность того, что передняя линза объектива проталкивается сквозь защитное стекло и не только портит образец, но и загрязняет объектив); но, наоборот, отводить глаз, поднимать трубку и начинать все сначала с шага 2.

Освещение темного грунта.—

1. Установите подставку для микроскопа в вертикальное положение и вставьте самый высокий доступный окуляр.

2. Снимите окуляр с трубки микроскопа и установите на место объектив диаметром 2/3 дюйма.

3. Снимите конденсатор дополнительного уровня и замените его конденсатором с темным заземлением.

4. Установите источник освещения на расстоянии примерно 30-50 см от микроскопа. (Это должна быть дуговая лампа Liliput (Leitz), лампа Нернста или газовая лампа накаливания; если используется любая из двух последних, между источником света и микроскопом должен быть установлен конденсор "яблочко" для получения параллельных лучей); и отрегулируйте источник освещения и микроскоп таким образом, чтобы зеркало в плоскости нижнего яруса было полностью заполнено светом.

5. Сфокусируйте два concentрических кольца, выгравированных на верхней поверхности конденсатора, и точно отцентрируйте их с помощью центрирующих винтов.
6. Подготовьте "свежий" образец (см. стр. 74-76) материала, который желательно исследовать, используя выбранные новые стеклянные пластины размером 3 на 1 толщиной менее 1 мм и защитные стекла № 1 (толщиной 0,17 мм), которые следует чистить куском мягкой кожи для мытья посуды, а не наждачной бумагой, поскольку царапины на стекле создают мутность при приготовлении.
7. Нанесите большую каплю масла для погружения (или чистой воды) на верхнюю поверхность конденсатора и переместите ее на несколько миллиметров вниз.
8. Установите свежий препарат на подставку для микроскопа и закрепите его с помощью зажимов для подставки.
9. Поднимайте конденсатор до тех пор, пока иммерсионная жидкость не соприкоснется с нижней поверхностью предметного стекла; избегайте образования пузырьков воздуха.
10. Отрегулируйте промежуточное зеркало таким образом, чтобы свет отражался вверх. Яркое пятно будет видно на свежем препарате ближе к центру поля.
11. Замените объектив с диагональю 2/3 дюйма на масляно-иммерсионный объектив с диагональю 1/12 дюйма, оснащенный специальным ограничителем для уменьшения его зазора; нанесите каплю иммерсионного масла на центр защитных стекол свежего препарата и опускайте трубку микроскопа до тех пор, пока передняя линза объектива не попадет в каплю масла.
12. Сфокусируйте яркое пятно, указанное на шаге 10. Если оно больше не занимает центр поля, измените угол наклона зеркала заднего вида, пока оно не займет это место.
13. Теперь точно сфокусируйте объектив на пленке, осторожно меняя высоту затемненного матового конденсора, пока не будет найдено наилучшее положение. Интенсивно освещенные бактерии будут ярко выделяться на темном фоне.

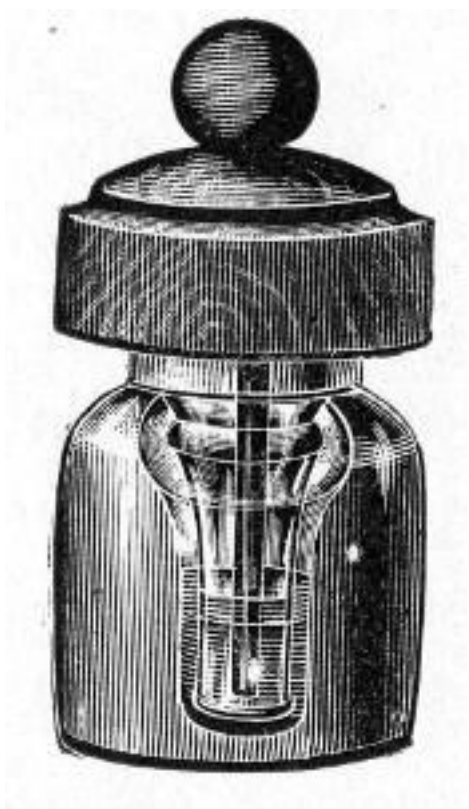


Рис. 70.—Бутылка для иммерсионного масла.

Микроскопическое исследование окрашенного образца.—(Основная трубка микроскопа может быть вертикальной или наклонена под углом.)

1. Закрепите предметное стекло на подставке микроскопа с помощью пружинных зажимов.
2. Нанесите каплю кедрового масла в центр обложки.

Масло для иммерсии представляет собой чистое масло кедрового дерева и хранится в маленькой бутылочке из прочного стекла (рис. 70), полость которой имеет форму перевернутого конуса и снабжена предохранительной воронкой (чтобы масло не вытекло при случайном опрокидывании бутылки) и пылезащитным колпачком из самшита, снабженным деревянной палочкой, с помощью которой капля масла наносится на защитное стекло или линзу.

3. Используйте масляную иммерсионную линзу микроскопа толщиной $1/12$ дюйма. Опускайте трубку корпуса так, чтобы передняя линза объектива соприкасалась с маслом и почти касалась защитной планки.
4. Поднимите конденсатор так, чтобы он соприкасался с нижней поверхностью предметного стекла.
5. Приложите глаз к окуляру и расположите плоское зеркало так, чтобы оно пропускало как можно больше света.
6. Поднимите трубку корпуса так, чтобы стала видна окрашенная пленка.
7. Точно сфокусируйте конденсатор на пленке.
8. Точно сфокусируйте пленку с помощью функции точной настройки.

VI. МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ.

На следующих страницах собраны различные "стандартные" красители, используемые в бактериологической лаборатории в повседневной жизни, а также подборка наиболее удобных и общепользованных методов окрашивания для демонстрации определенных структур или дифференциации групп бактерий. Используемые красители должны быть либо приготовлены компанией Gruebler из Лейпцига, либо компанией Merck из Дармштадта. Методы, напечатанные обычным шрифтом, — это те, которые, как показал многолетний опыт, являются наиболее надежными и дают наилучшие результаты; к методам, напечатанным мелким шрифтом, относятся такие, которые не являются общепользованными, но дают отличные результаты в руках опытного работника.

ПЯТНА ОТ БАКТЕРИЙ.

Метиленовый синий.-

1. Насыщенный водный раствор.

Взвесить

Метиленовый синий 1,5 грамма

Перелейте в закупоренную бутылку вместимостью от 150 до 200 гр. и добавьте

Дистиллированная вода 100,0 °с

Дайте воде оставаться в контакте с красителем в течение двух недель, энергично встряхивая содержимое флакона в течение нескольких минут каждый день. Фильтр.

2. Насыщенный спиртовой раствор.

Взвесить

Метиленовый синий 1,5 грамма

Перелейте в закупоренную бутылку емкостью 150 гр. и добавьте

Спирт 90%-ный 100,0%-ный

Оставьте спирт в контакте с красителем на два часа, энергично встряхивая каждые несколько минут. Фильтр.

3. Карболовый метиленовый синий (Кюне).

Взвесить

Метиленовый синий 1,5 грамма
Карболовой кислоты 5,0 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 100,0 °с

и добавить

Абсолютный спирт 10,0 с.с.

Фильтр.

4. *Щелочной метиленовый синий* (Леффлер).

Отмерьте и перемешайте

Метиленовый синий, насыщенный спиртовой раствор 30,0 °с.

Едкий калий, 0,1%. водный раствор 100,0 °с

Фильтр.

Горечавка фиолетовая.—

5. *Насыщенный водный раствор.*

Взвесить

Горечавка фиолетовая 2,25 грамма

и действуйте так же, как при приготовлении соответствующего раствора метиленового синего.

6. *Насыщенный спиртовой раствор.*

Взвесить

Горечавка фиолетовая 5,0 грамма

и действуйте так же, как при приготовлении соответствующего раствора метиленового синего.

7. *Карболовая горечавка фиолетовая* (Николле).

Отмерьте и перемешайте

Горечавка фиолетовая, насыщенный спиртовой раствор 10,0 °с.

Карболовая кислота, 1%. водный раствор 100,0 °с

Фильтр.

8. *Водный раствор анилина* (Коха-Эрлиха).

Отмерьте

Дистиллированная вода 100 °с

Добавляйте анилиновое масло по капле (хорошо встряхивая после добавления каждой капли), пока раствор не станет непрозрачным.

Процедите до прозрачности.

и добавить

Абсолютный спирт 10°с.

Насыщенный спиртовой раствор горечавки фиолетовой 11 °с.

Фильтр.

Примечание.—Этот раствор не будет храниться дольше 14 дней.

Тиониновый синий (или фиолетовый Лаута).—

9. *Карболовый тиониновый синий* (Николле).

Взвесить

Тиониновый синий 1,0 грамм

Карболовой кислоты 2,5 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 100,0 °с

Фильтр.

Перед употреблением разбавьте равным количеством дистиллированной воды и снова процедите.

Фуксин (основной).—

10. *Насыщенный водный раствор.*

Взвесить

Основной фуксин 1,5 грамма

и действуйте так же, как при приготовлении соответствующего раствора метиленового синего (*количественно*).

11. *Насыщенный спиртовой раствор.*

Взвесить

Основной фуксин 3,5 грамма

и действуйте так же, как при приготовлении соответствующего раствора метиленового синего.

12. *Карболовый фуксин (Циль).*

Взвесить

Основной фуксин 1,0 грамм

Карболовой кислоты 5,0 грамм

раствориться в

Дистиллированная вода 100,0 °с

и добавить

Абсолютный спирт 10,0 с.с.

Фильтр.

КОНТРАСТНЫЕ ПЯТНА.

Эозин.—Существует несколько коммерческих разновидностей эозина, которые с бактериологической точки зрения обладают совершенно разными свойствами. Грюблер перечисляет четыре разновидности, из которых только две пригодны для бактериологической работы:

Эозин, водный желтоватый.

Эозин, водный голубоватый.

13. *Водный раствор эозина (желтоватого или голубоватого оттенка), 1%.*

Взвесить

Эозин водный 1,0 грамм

раствориться в

Дистиллированная вода 100,0 °с

и добавить

Абсолютный спирт 5,0 с.с.

Фильтр.

14. *Спиртовой раствор эозина 0,5%.*

Взвесить

Эозин спиртовой 0,5 грамма

и раствориться в

Алкоголь (70%) 100,0%.

Фильтр.

Сафранин.—

15. *Водный раствор.*

Взвесьте.

Сафранин 0,5 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 100,0 °с

Фильтр.

Нейтрально—красный.-

16. *Водный раствор.*

Взвесить

Нейтральный красный 1,0 грамм

и раствориться в

Дистиллированная вода 100,0 °с

Фильтр.

Везувин (или Бисмарк Браун).—

17. *Насыщенный водный раствор.*

Взвесить

Везувин 0,5 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 100,0 °с

Фильтр.

ПЯТНА НА ТКАНЯХ.

Анилиновый горечавково—фиолетовый (Для окрашивания фибрином Вайгерта).-

Взвесить

Горечавка фиолетовая 1,0 грамм

и раствориться в

Абсолютный спирт 15,0 с.с.

Дистиллированная вода 80,0 с.с.

затем добавьте

Анилиновое масло 3,0 с.с.

Перед употреблением хорошо взболтайте и процедите.

Hæmatoxylin (Ehrlich).—

1. Взвесьте

Гематоксилин 2,0 грамма

и раствориться в

Абсолютный спирт 100,0 с.с.

2. Взвесьте

аммонийные квасцы 2,0 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 100,0 °с

3. Смешайте 1 и 2, дайте смеси настояться сорок восемь часов, затем процедите.

4. Добавить

Глицерин 85,0 с.с.

Уксусная кислота ледяная 10,0 с.с.

5. Дайте пятну постоять в течение месяца на свету; затем снова процедите, готовое к использованию.

Хематин (Майера).—

A. Взвесить

Гематин 1,0 грамм

и раствориться в

Спирт 90%. (подогретый до 37°C) 50°C.

B. Взвесить

Калийные квасцы 50 грамм

и раствориться в

Дистиллированная вода 100 °с

Приготовьте эти два раствора в отдельных колбах. Возьмите чистую колбу емкостью 250 °с и вставьте в ее горлышко большую воронку. Налейте растворы А и В одновременно и медленно в воронку для тщательного перемешивания. Храните для дальнейшего использования.

Примечание.—Если требуется кислотный гематин, добавьте ледяную уксусную кислоту (3 ст.Л.) в колбу для смешивания перед добавлением растворов А и В.

Карминовые квасцы (Майер).—

Взвесить

Квасцы 2,5 грамма

Кармина 1,0 грамма

и перелейте в стеклянный стакан.

Отмерьте в мерном цилиндре,

Дистиллированная вода 100,0 °с

Поставьте стакан на песчаную баню, постепенно добавляйте воду небольшими порциями и держите смесь кипящей в течение двадцати минут. Отмерьте раствор и доведите до 100°с путем добавления дистиллированной воды. Фильтр.

Кармин лития (Orth).—

Взвесить

Кармин 2,5 грамма

и раствориться в

Карбонат лития, холодный насыщенный раствор 100,0 °с

Фильтр.

Пикрокармин.—

Взвесить

Пикрокармин 2,0 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 100,0 °с

ПЯТНА КРОВИ

При смешивании водных растворов медицинского метиленового синего и водорастворимых эозин образуются осадок, растворимый только в спирте, и растворы этого осадка придают хроматину специфический красновато-фиолетовый цвет. Это соединение было впервые использовано Романовским для демонстрации малярийных паразитов, но в настоящее время различные модификации используются для окрашивания пленок крови в целом, а также бактерий и простейших. Лучшими модификациями оригинального Romanowsky являются модификации Дженнера и Лейшмана — Дженнер наиболее подходит для гистологического исследования крови, а Лейшман - для демонстрации простейших.

Пятно Дженнера.—

А. Взвешивание:

Эозин водный желтый 6,0 грамма

Раствориться в

Дистиллированная вода (нейтральная) 250 °с

Таким образом получится густой раствор.

В. Взвешивание:

Метиленовый синий (лекарственно чистый) Hoechst 5,0 грамма

Раствориться в

Дистиллированная вода (нейтральная) 250 °с

1. Добавляйте В к А очень медленно, все время помешивая. Образуется вязкий осадок, который часто теряет свою вязкость при нагревании. (Это объясняет необходимость медленного перемешивания).

2. Медленно выпаривайте в фарфоровой посуде, периодически помешивая, на водяной бане при температуре 55 ° С. Когда начнет образовываться паста, время от времени соскребайте и разламывайте. (Ни в коем случае нельзя допускать, чтобы паста расплавилась.)

3. Измельчите полученную массу в аморфный порошок.

4. Взвесьте:

Аморфный порошок 0,5 грамма

Раствориться в

Метиловый спирт (Merck puriss, для анализа) 100 гр.

Дайте время для правильного решения. (Достаточно около трех дней.)

Способ.—

1. Подготовьте пленку, высушите, но *не закрепляйте*.
2. Залейте незафиксированную пленку морилкой, дайте ей подействовать в течение 3 минут (метиловый спирт, содержащийся в морилке, закрепляет пленку).
3. Сотрите пятно и стирайте дистиллированной водой, пока пленка не приобретет розовый цвет.
4. Высушите и смонтируйте.

Пятно Лейшмана.—

А. Взвесьте:

Метиленовый синий (лекарственный) 1 грамм

Раствориться в

Карбонат натрия 0,5%. водный раствор при 100°С

Хранить при температуре 65° С в течение 12 часов либо в горячем инкубаторе, либо на водяной бане; затем выдержать в темном месте при комнатной температуре (20°С) в течение десяти дней.

В. Взвешивать:

Эозин, extra B. A. 0,1 грамм

Раствориться в

Дистиллированная вода 100 °С

1. Смешайте два раствора А и В в равных объемах, и дайте смеси настояться в течение 12 часов, периодически перемешивая.
2. Процедите и соберите осадок на фильтровальную бумагу.
3. Тщательно промойте осадок дистиллированной водой и высушите.
4. Взвесьте 0,15 грамма сухого осадка; разотрите в ступке с 5 мл метилового спирта (Merck puriss, для анализа).

Дайте нерастворенному порошку отстояться, затем перелейте надосадочную жидкость в чистый мерный цилиндр при температуре 100°С.

5. Добавьте еще 5 ст.л. спирта к осадку в ступке и повторите процесс, и так далее, пока весь осадок не растворится.
6. Теперь доведите температуру жидкости в мерном цилиндре до 100 °С, добавив еще метилового спирта.

Способ.—

1. Подготовьте пленку, высушите, но *не закрепляйте*.
2. Залейте незафиксированную пленку морилкой, дайте ей подействовать в течение 30 секунд.
3. Добавьте в пятно на пленке вдвое больше дистиллированной воды и перемешайте стеклянной палочкой или платиновой петлей.
4. Дайте этому разбавленному красителю подействовать пять минут.
5. Смойте дистиллированной водой.
6. Оставьте немного воды на пленке на тридцать секунд, чтобы усилить цветовой контраст.
7. Высушите и смонтируйте.

МЕТОДЫ ДЕМОНСТРАЦИИ СТРОЕНИЯ БАКТЕРИЙ И Т.Д.

Для демонстрации капсул.

1. MacConkey.—

Пятно.—

Взвесить

Георгин 0,5 грамма

метилового зеленого (00 кристаллов) 1,5 грамма

растереть в ступке с

Дистиллированная вода 100,0 °с

Добавить

Фуксин, насыщенный спиртовой раствор 10,0 °с

и доводят до 200°с путем добавления

Дистиллированная вода 90,0 °с

Фильтр.

Перед использованием дайте пятну настояться в течение двух недель; храните в темном месте или в бутылке из янтарного стекла. Из-за нестабильного характера метилового зеленого это пятно портится примерно через шесть месяцев.

Способ.—

1. Подготовьте и закрепите пленку обычным способом.
2. Залейте краску на покровную полосу и дайте ей подействовать в течение пяти-десяти минут.

3. Очень тщательно промойте пленку в воде; при необходимости направьте на нее мощную струю воды из бутылочки для мытья.

4. Высушите и смонтируйте.

2. Метод Мьюира.—

1. Подготовьте, высушите и закрепите пленку обычным способом.

2. Залейте пленку карболовым фуксином, нагревайте, пока не начнет подниматься пар. Дайте пятну подействовать в течение тридцати секунд.

3. Быстро промойте метилированным спиртом.

4. Тщательно промойте водой.

5. Подвергните пленку воздействию следующей протравы на пять секунд:

Едкий сублимат, насыщенный водный раствор 2°с.

Дубильная кислота, 20%. водный раствор 2°с.

Водный раствор, насыщенный калийными квасцами 5 °с.

6. Тщательно промойте в воде.

7. Обработывайте метилированным спиртом около шестидесяти секунд. (Теперь препарат должен стать бледно-красным.)

8. Тщательно промойте в воде.

9. Выдержите в водном растворе метиленового синего тридцать секунд.

10. Промойте в воде.

11. Обезвоживать в спирте.

12. Обваляйте в ксилоле и добавьте в ксилоловый бальзам.

3. Метод Уэлча.—

1. Подготовьте и закрепите пленку обычным способом.

2. Залейте предметное стекло 2-процентной уксусной кислотой; оставьте кислоту в контакте с пленкой на две минуты. Это набухает, фиксирует капсулу и позволяет ей впитывать пятно.

3. Сдуйте уксусную кислоту с помощью пипетки.

4. Погрузите в анилиновую горечавку фиолетовую на пять-тридцать секунд.

5. Промойте в воде.

6. Высушите и смонтируйте.

4. Метод Рибберта.—

Пятно.—

Отмерьте и смешайте:

Уксусная кислота ледяная, 12,5°с,

Спирт абсолютный 50,0 °с,

Вода дистиллированная, 100,0°с, нерастворимая, нерастворимая

Нагрейте до 36°С (*например*, в "горячем" инкубаторе) и насытите георгинами. Фильтр.

Способ.—

1. Подготовьте и закрепите пленки обычным способом.
2. Накройте пятно пленкой и дайте ему подействовать всего на одну-две секунды.
3. Тщательно промойте в воде.
4. Высушите и смонтируйте.

Для демонстрации жгутиков.

1. Модифицированное Питфилдом Мьюира.—Это наилучший метод, который дает наиболее надежные результаты, поскольку не только процент успешных препаратов выше, чем при использовании любого другого, но и бациллы и жгутики сохраняют свои относительные пропорции.

а) Протравитель.—

Дубильная кислота, 10%. водный раствор 10°с

сублимата коррозии, насыщенный водный раствор 5°с

Квасцов, насыщенный водный раствор 5°с

Карболовый фуксин (Циль) 5°с

Тщательно перемешайте.

Образуется осадок, которому необходимо дать отстояться в течение нескольких часов.

Прозрачную жидкость слейте в пробирки и тщательно центрифугируйте.

Этот раствор лучше всего использовать через четыре-пять дней после изготовления; он сохраняется примерно пару недель, но каждый раз перед использованием его необходимо повторно центрифугировать.

(б) Пятно.—

Квасцы, насыщенный водный раствор 25°с.

Горечавка фиолетовая, насыщенный спиртовой раствор 5°с.

Фильтр.

Эта краска должна быть свежеприготовленной.

Способ.—Используемые культуры должны быть выращены на мазковом агаре возрастом от двенадцати до восемнадцати часов при инкубации при 37 ° С, от двадцати четырех до тридцати часов при инкубации при 22 ° С.

1. Удалите очень небольшое количество наростов с помощью платиновой лопаточки.
2. Сделайте эмульсию с несколькими кубическими сантиметрами дистиллированной воды в часовом стекле, осторожно перемещая лопаточку туда-сюда в воде. Не трите нарост на боковой поверхности часового стекла. Некоторые рабочие предпочитают использовать воду из-под крана, другие используют обычный физиологический раствор, но дистиллированная вода дает лучшую эмульсию.
3. Нанесите тонкую пленку эмульсии на только что обожженный покровный лист, не прикладывая усилий, а *направляя* каплю по покровному листу платиновой петлей.
4. Дайте пленке высохнуть на воздухе, должным образом защищенной от попадания пыли.
5. Закрепите, трижды пропустив через пламя Бунзена, удерживая при этом накладку за один уголок большим и указательным пальцами.
6. Вылейте на пленку столько протравы, сколько выдержит защитное стекло. Возьмите защитную пленку щипцами и держите ее высоко над пламенем, пока не поднимется пар. Оставьте дымящуюся протраву в контакте с пленкой на две минуты.
7. Хорошо промойте в воде и тщательно высушите.
8. Нанесите на пленку столько морилки, сколько выдержит защитное стекло. Готовьте на пару над огнем, как и раньше, в течение двух минут.
9. Хорошо промойте в воде.
10. Высушите и смонтируйте.

2. Оригинальный метод "Питфилда".—

а) *Протравитель*.—

Дубильная кислота	1 грамм
Воды	10 гр.

(б) *Пятно*.—

Насыщенный водный раствор квасцов	10°с.
Насыщенный спиртовой раствор горечавки фиолетовой	1°с.
Дистиллированная вода	5°с.

Перед использованием смешайте равные части *a* и *b*.

1. Подготовьте и закрепите пленку способом, описанным выше.

2. Вскипятите смесь и опустите в нее еще горячую салфетку на одну минуту.
3. Промойте в воде.
4. Проверьте в воде; если удовлетворительно, высушите и смонтируйте в канадском бальзаме.

3. Метод Мак—Крорри.-

Протравное пятно.-

Отмерьте и перемешайте.

Темно-синие, насыщенный спиртовой раствор 10°с.

Калийные квасцы, насыщенный водный раствор 10°с.

Танин, 10%. водный раствор 10 °с

Примечание.—Добавление галловой кислоты в количестве 0,1-0,2 грамма может улучшить раствор, но в этом нет необходимости.

Способ.—

1. Подготовьте и закрепите пленки, как указано выше.
2. Нанесите немного протравы на пленку и осторожно прогрейте высоко над пламенем в течение двух минут (или поместите в "горячий" инкубатор на аналогичный период).
3. Тщательно промойте в воде.
4. Высушите и смонтируйте.

4. Метод Леффлера.—

а) Протравитель.—

Дубильная кислота, 20%. водный раствор 10°с

сульфата железа, насыщенный водный раствор 5°с

Гематоксилина, раствор 3°с

Карболовой кислоты, 1%. водный раствор 4 °с

Этот раствор должен быть свежеприготовленным.

Раствор гематоксилина готовят путем кипячения 1 грамма бревенчатой древесины

дистиллированной водой 8°с, фильтрующей и восполняющей потери при испарении.

Альтернативная протрава (Протрава Бунге).—

Дубильная кислота, 20%. водный раствор 10°с

сульфата железа, насыщенный водный раствор 5°с

Фуксина, насыщенный спиртовой раствор 1 °с

(б) *Пятно.*—

Взвесить

Метиленовый синий	}
Или метиленовый фиолетовый	} 4 грамма
Или фуксин	}

и раствориться в

Анилиновая вода, свеженасыщенная и отфильтрованная 100 °с

Способ.—

1. Подготовьте и закрепите пленки, как указано выше.
2. Вылейте протраву на пленку и осторожно прогревайте на огне, пока не поднимется пар; оставьте протраву слегка пропариваться в течение одной минуты.
3. Тщательно промойте дистиллированной водой, пока не исчезнет цвет; при необходимости тщательно промойте абсолютным спиртом.
4. Нанесите несколько капель средства на пленку, прогрейте, как и раньше, и дайте пятну распариться в течение одной минуты.
5. Хорошо промойте в дистиллированной воде.
6. Высушите и смонтируйте.

Примечание.—Жгутики некоторых организмов можно лучше продемонстрировать с помощью щелочного окрашивания или кислотного окрашивания — для каждого из них необходимо определить балл. Вообще говоря, те бациллы, которые вызывают кислую реакцию в питательной среде, нуждаются в щелочи; те, которые образуют щелочь при культивировании, нуждаются в кислоте. Таким образом, в соответствии с требованиями Loeffler рекомендует добавлять 1% гидрата натрия. водный раствор, 1 ст.л.; или равное количество точно сопоставимого раствора серной кислоты.

5. Метод Ван Эрменгема.—Этот метод, представляющий собой простое осаждение соли серебра на микроорганизмы, а не настоящее окрашивание, создает ложное впечатление относительно относительных пропорций бактерий и жгутиков.

(а) *Фиксирующая жидкость.*—

Осминовая кислота, 2%. водный раствор	10°с.
Дубильная кислота, 20%. водный раствор	20°с
уксусной кислоты, ледяной	1 °с

Фиксирующую жидкость следует приготовить за несколько дней до использования и при необходимости отфильтровать. По цвету она должна быть отчетливо фиолетовой.

(b) Сенсibiliзирующий раствор.—

Нитрат серебра 0,5%. водный раствор.

Этот раствор следует хранить в бутылке из темно-синего стекла или в темном шкафу.

Процедите непосредственно перед использованием.

(c) восстанавливающий раствор.—

Взвесить

Галловая кислота	5 граммов
------------------	-----------

Дубильной кислоты	3 грамма
-------------------	----------

Ацетата калия, плавленого	10 граммов
---------------------------	------------

и раствориться в

Дистиллированная вода 350 °с

Фильтр.

Этот раствор сохраняет активность в течение нескольких дней, но для каждого приготовления необходимо использовать свежий раствор.

Способ.—

1. Приготовьте эмульсию, сделайте и закрепите пленки, как описано выше в предыдущем методе, шаги 1-4.

2. Налейте на пленку столько фиксирующего раствора, сколько сможет вместить защитное стекло, осторожно подогрейте на огне, пока не поднимется пар, и дайте испаряющейся фиксирующей жидкости подействовать в течение пяти минут.

3. Хорошо промойте в воде.

4. Промойте в абсолютном спирте.

5. Промойте в дистиллированной воде.

6. Налейте немного сенсibiliзирующего раствора на пленку и дайте ему подействовать в течение от тридцати секунд до одной минуты; промокните излишки жидкости фильтровальной бумагой.

7. Не смывая, перенесите пленку на часовое стекло, содержащее восстанавливающий раствор, и оставьте ее в нем от тридцати секунд до одной минуты; промокните излишки жидкости фильтровальной бумагой.

8. Не смывая, снова обработайте пленку сенсibiliзирующим раствором, на этот раз до тех пор, пока пленка не начнет чернеть.

9. Промойте в дистиллированной воде.

10. Высушите и смонтируйте.

Для окрашивания ядер дрожжевых клеток.

1. Подготовьте и закрепите пленку обычным способом.

2. Замочите в 3-процентном растворе сульфата аммиака трехвалентного железа. водный раствор на два часа.

3. Тщательно промойте в воде.

4. Пропитайте пятно раствором гематоксилина (см. стр. 95) в течение тридцати минут.

5. Промойте в воде.

6. Дифференцируйте в растворе сульфата аммиака трехвалентного железа в течение 1-1 / 2-2 минут, исследуя влагу под микроскопом во время процесса.

Для окрашивания спор.

1. Одиночное пятно.—

1. Приготовьте защитную пленку обычным способом.

2. При закреплении пропустите защитную пленку через пламя пятнадцать или тридцать раз вместо трех. Это разрушает сопротивляющую способность мембраны спор и позволяет пятну проникнуть внутрь.

3. Окрашивание обычным способом метиленовым синим или фуксином.

4. Промойте в воде.

5. Высушите и смонтируйте.

2. Двойное окрашивание.—

1. Подготовьте и закрепите пленку обычным способом —*т.е.* трижды пропустите через огонь для закрепления.

2. Покройте пленку горячим карболфуксином и подержите пинцетом над небольшим пламенем, пока жидкость не начнет испаряться. Накройте пленкой и дайте остыть. Повторите процедуру, когда от морилки перестанет идти пар, и продолжайте повторять, пока пятно не соприкоснется с пленкой в течение двадцати минут. (Это окрашивает как споры, так и бактерии.)

3. Промойте в воде.

4. Обесцветить в спирте, 2 части; уксусной кислоте, 1%, 1 часть. (Это удаляет пятно со всего, кроме спор.)

5. Промойте в воде.

6. Опустите накладку в воду и исследуйте под микроскопом с помощью объектива диаметром 1/6 дюйма. (Споры должны быть красными, а остальная часть пленки бесцветной или очень светло-розовой.) Если удовлетворительно, переходите к разделу 7; если неудовлетворительно, повторите шаги 2-5.

7. Нанесите слабую метиленовую синьку. (Теперь споры красные, бациллы синие.)

8. Промойте в воде.

9. Высушите и смонтируйте.

Споры разных бацилл сильно различаются по своей устойчивости к обесцвечивающим реагентам; даже споры одних и тех же видов организмов различаются в зависимости от их возраста. Молодые споры легче обесцвечиваются, чем более зрелые.

Серная кислота, 1%. водный раствор и соляная кислота, 0,5%. спиртовой (90-процентный) раствор является полезным обесцвечивающим реагентом.

3. Метод Меллера.—

1. Подготовьте и закрепите пленки обычным способом.

2. Погрузите в абсолютный спирт на две минуты, затем в хлороформ на две минуты; промойте водой. Это растворяет любой жир или кристаллы, которые в противном случае могли бы сохранить пятно от "спор".

3. Погрузите в 5%-ный водный раствор хромовой кислоты. на одну минуту; промойте водой.

4. Залейте пленку карболовым фуксином Ziehl's carbolic fuchsin, разогрейте, как в предыдущих методах, и дайте ему подействовать в течение десяти минут.

5. Промойте в воде.

6. Обесцвечивать в 5-процентной серной кислоте. водный раствор в течение пяти секунд.

7. Промойте в воде.

8. Нанесите карболовую метиленовую синьку Кюне на одну-две минуты.

9. Промойте в воде.

10. Высушите и смонтируйте.

(Споры красные, бациллы синие.)

4. Метод Эбботта.—

1. Подготовьте и закрепите пленки обычным способом.

2. Вылейте щелочную метиленовую синьку Loeffler's на пленку; осторожно прогревайте над пламенем, пока не поднимется пар, и дайте горячему пару подействовать в течение одной-пяти минут.

3. Тщательно промойте в воде.
4. Обесцветить в 2-процентной азотной кислоте. спиртовой (80-процентный спирт) раствор.
5. Тщательно промойте в воде.
6. Противовес в 1%-ном растворе эозина. водный раствор.
7. Умыться.
8. Высушите и смонтируйте.

(Споры синие, бациллы красные.)

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ.

Метод грэма.—Этот метод основан на том факте, что протоплазма некоторых бактерий позволяет анилиновому горечавчатому фиолетовому и раствору йода Люголя при последовательном нанесении вступать в химическую комбинацию, которая приводит к образованию нового сине-черного пигмента, лишь очень слабо растворимого в абсолютном спирте. Говорят, что такие организмы "окрашиваются по граму" или являются "грамположительными".

1. Подготовьте защитную пленку и закрепите обычным способом.
2. Окрасьте анилиновой горечавкой фиолетового цвета на три-пять минут. Отфильтруйте на покровную пленку столько анилиновой воды, сколько в нее поместится; затем добавьте наименьшее количество спиртового раствора горечавки фиолетовой, которого достаточно для насыщения анилиновой воды и образования "бронзовой пены" на ее поверхности - при добавлении слишком большого количества спиртовой горечавки фиолетовой присутствующий спирт повторно растворяет эту пену.

Чтобы приготовить анилиновую воду, налейте 4 или 5 ст.л. анилинового масла в бутылку с закрытой пробкой и добавьте дистиллированную воду при температуре 100 °С. Тщательно встряхните и отфильтруйте непосредственно перед использованием. Излишки масла стекают на дно флакона и могут быть использованы повторно.

3. Промойте в воде.
4. Обрабатывайте йодным раствором Люголя, пока пленка не станет черной или темно-коричневой.

Для этого обработайте пленку раствором йода на несколько секунд, промойте водой и осмотрите ее поверх листа белой фильтровальной бумаги. Обратите внимание на цвет. Повторяйте этот процесс до тех пор, пока пленка не перестанет темнеть при новом нанесении раствора йода.

Раствор Люголя готовят путем растворения

Йод	1 грамм
-----	---------

йодида калия 3 грамма
В дистиллированной воде При 300 °с

5. Промойте в воде.

6. Промывайте спиртом до тех пор, пока не прекратится выделение красителя и спирт не станет прозрачным и бесцветным.

В качестве обесцвечивающего средства абсолютный спирт можно заменить следующей смесью

Ацетон 10°с.
Абсолютный спирт 100 °с.

7. Промойте в воде.

8. Нанесите очень слегка водный раствор нейтрального красного цвета. Можно использовать другие противоокрашивающие средства, такие как разбавленный эозин, разбавленный фуксин или везувин.

Примечание.—Этот раздел может быть опущен при работе с пленками, полученными в результате чистого культивирования.

9. Промойте в воде.

10. Высушите и смонтируйте.

Метод Грамма-Клавдия.—

1. Подготовьте защитную пленку и закрепите обычным способом.

2. Окрашивание метилфиолетовым, 1%. водный раствор в течение трех-пяти минут.

3. Обработайте двумя порциями насыщенного водного раствора пикриновой кислоты.

4. Промойте в воде и высушите.

5. Обесцветьте гвоздичным маслом.

6. Смойте гвоздичное масло с ксилолом.

7. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

Метод Грама-Вейгерта.—

1-5. Действуйте так же, как в соответствующих разделах метода Грэма (*смотрите видео*).

6. Высушите на воздухе.

7. Стирать в анилиновом масле (1 часть) и ксилоле (2 части), пока не исчезнет цвет.

8. Промойте в ксилоле.

9. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

Модифицированный метод Грама-Вейгерта.—(Для демонстрации трихофиты в волосах.)

1. Замочите волосы в эфире на десять минут, чтобы удалить жир.
2. Окрасьте на тридцать минут похожим на смолу раствором анилиновой горечавки фиолетовой (готовится добавлением 15 капель спиртового раствора горечавки фиолетовой к 3 каплям анилиновой воды).
3. Высушите волоски между кусочками промокательной бумаги.
4. Обработайте совершенно свежим раствором йода.
5. Снова высушите между промокательной бумагой.
6. Обработайте анилиновым маслом, чтобы удалить излишки пятна. (При необходимости добавьте в масло одну-две капли азотной кислоты.)
7. Снова обработайте анилиновым маслом.
8. Обработайте анилиновым маслом и ксилолом в равных частях.
9. Смыть ксилолом.
10. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

Для получения наилучшей дифференцировки препарат следует многократно исследовать под микроскопом (с объективом диаметром 1/6 дюйма) между этапами 5 и 9, поскольку фактическое время, затрачиваемое на анализ, различается для разных образцов.

Метод Циля-Нельсена.—(Для демонстрации туберкулезных и других кислотоустойчивых бацилл.)

1. Нанесите тонкую, ровную пленку образца на покровный лист с помощью платиновой петли. (В случае мокроты, если она очень водянистая, дайте пленке высохнуть, затем нанесите второй и даже третий слой поверх первого.)
2. Закрепите, трижды пропустив через пламя.
3. Окрашивайте горячим карболфуксином (как при окрашивании на споры) в течение пятидесяти минут. (Это окрашивает все на пленке.) Избегайте перегрева.
4. Обесцветить, окунув в 25-процентную серную кислоту. (Это удаляет пятна от всего, кроме кислотоустойчивых бацилл; *например*, бацилл туберкулеза, проказы и смегмы, и пленка становится желтой.)
5. Промойте в воде. (Пленка снова приобретает бледно-красный цвет).
6. Стирайте в спирте до тех пор, пока не исчезнет цвет. (Это часто, но не всегда, удаляет пятно от кислотоустойчивых бацилл, отличных от туберкулезных; *например*, бациллы смегмы.)
7. Промойте в воде.

8. Окрашивание слабым метиленовым синим. (Окрашивает некислотоустойчивые бациллы, лейкоциты, эпителиальные клетки и т.д.)

9. Промойте в воде, высушите и установите.

Метод Паппенгейма.—

Предполагается, что этот метод позволяет проводить различие между *B. tuberculosis* и другими кислотостойкими микроорганизмами.

1. Подготовьте и закрепите пленку обычным способом.

2. Окрашивайте карболфуксином *без нагревания* в течение трех минут.

3. Без предварительной промывки в воде обработайте пленку тремя или четырьмя последовательными нанесениями раствора кораллина (розоловой кислоты).

Кораллин	1 грамм
Метиленового синего (насыщенный спиртовой раствор)	100 г
Глицерина	20 г

4. Промойте в воде.

5. Высушите и смонтируйте.

Модифицированный метод Найссера.— (Для демонстрации дифтероидных бацилл.)

Пятно I.—

Отмерьте и перемешайте

Метиленовый синий, насыщенный спиртовой раствор,	4,0°с.
Уксусная кислота, 5%. водный раствор	96,0 °с

Фильтр.

Пятно II.—

Взвесить

Нейтральный красный 2,5 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 1000 °с

Фильтр.

Способ.—

1. Подготовьте и закрепите пленки обычным способом.

2. Нанесите средство stain I на пленку и дайте ему подействовать в течение двух минут.
3. Тщательно промойте в воде.
4. Обработайте йодом Люголя в течение десяти секунд.
5. Тщательно промойте в воде.
6. Нанесите средство stain II на пленку и дайте ему подействовать в течение тридцати секунд.
7. Тщательно промойте в воде.
8. Высушите и смонтируйте.

Примечание. Культивирование, из которого получают пленки, должно проводиться на сыворотке крови, которая инкубировалась при 37 ° С в течение от девяти до восемнадцати часов.

Бациллы окрашиваются в светло-красный нейтральный красный цвет, который хорошо контрастирует с двумя или тремя черными пятнами, расположенными на полюсах, а иногда и одним в центре, представляющими протоплазматические скопления (? метакроматические гранулы), окрашенные кислым метиленовым синим.

Метод Уила и Чауна (Оксфорд).—(Для демонстрации актиномицетов.)

1. Кратковременно прокрасьте гематоксилином Эрлиха (пока зародыши не станут бледно-голубыми после промывания водопроводной водой).
2. Вымойте в водопроводной воде.
3. Пропитайте горячим карболфуксином (как для туберкулезных палочек) в течение пяти-десяти минут.
4. Вымойте в водопроводной воде.
5. Обесцветить спиртом пикриновой кислоты Шпенглера. Готовится путем смешивания:

Спирт абсолютный	20°с
Пикриновая кислота, насыщенный водный раствор	10°с
Дистиллированная вода	10°с

В ходе выполнения этапов 1-5 препарат необходимо повторно исследовать под микроскопом с помощью объектива диаметром 1/6 дюйма.

При правильной дифференциации клубни кажутся ярко-красными на зеленоватом фоне.

6. Обезвоживать в спирте.
7. Обвалять в ксилоле.
8. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

Этот метод одинаково хорошо подходит как для пленок, так и для срезов.

VII. МЕТОДЫ ДЕМОНСТРАЦИИ БАКТЕРИЙ В ТКАНЯХ.

Для бактериологических целей срезы тканей удобнее всего готовить либо **методом замораживания**, либо **парафиновым методом**.

Последнее, безусловно, предпочтительнее, но поскольку более важно продемонстрировать бактерии, если таковые присутствуют, чем сохранить элементы ткани в неизмененном виде, "замороженные" срезы часто имеют ценность.

Какой бы метод ни был выбран, необходимо брать небольшие кусочки ткани для нарезки, по возможности от 2 до 5 мм. кубиками, но ни в коем случае не более половины сантиметра толщиной. Посмертный материал должен быть собран как можно скорее после смерти животного.

Ткань подготавливается к разрезанию путем...

(а) Фиксация; то есть вызывание гибели клеточных элементов таким образом, что они сохраняют свою характерную форму.

Обычно используются следующие фиксирующие жидкости: Абсолютный спирт; едкий сублимат, насыщенный водный раствор; едкий сублимат, раствор Ланга (*вид*, стр. 82); формальдегид, 4%. водный раствор. (Из них коррозионный сублиматный раствор Ланга, безусловно, является лучшим универсальным "фиксатором".)

(b) затвердевание; то есть придание ткани достаточной консистенции для того, чтобы из нее можно было вырезать тонкие ломтики или "срезы". Это достигается путем последовательного пропускания ткани через спирты постепенно увеличивающейся крепости: 30%. спирт - 50%. спирт - 75%. спирт - 90%. алкоголь, абсолютный алкоголь.

В обоих этих процессах всегда следует использовать большой избыток жидкости.

СПОСОБ ЗАМОРАЖИВАНИЯ.

1. Фиксация. Поместите кусочки ткани в стеклянную бутылку с широким горлышком и залейте абсолютным спиртом. Оставьте ткани в нем на двадцать четыре часа.

2. Упрочнение. Удалите спирт (больше не абсолютный, так как он впитал воду из салфеток) из бутылки и замените его свежим абсолютным спиртом. Оставьте ткани в нем на двадцать четыре часа.

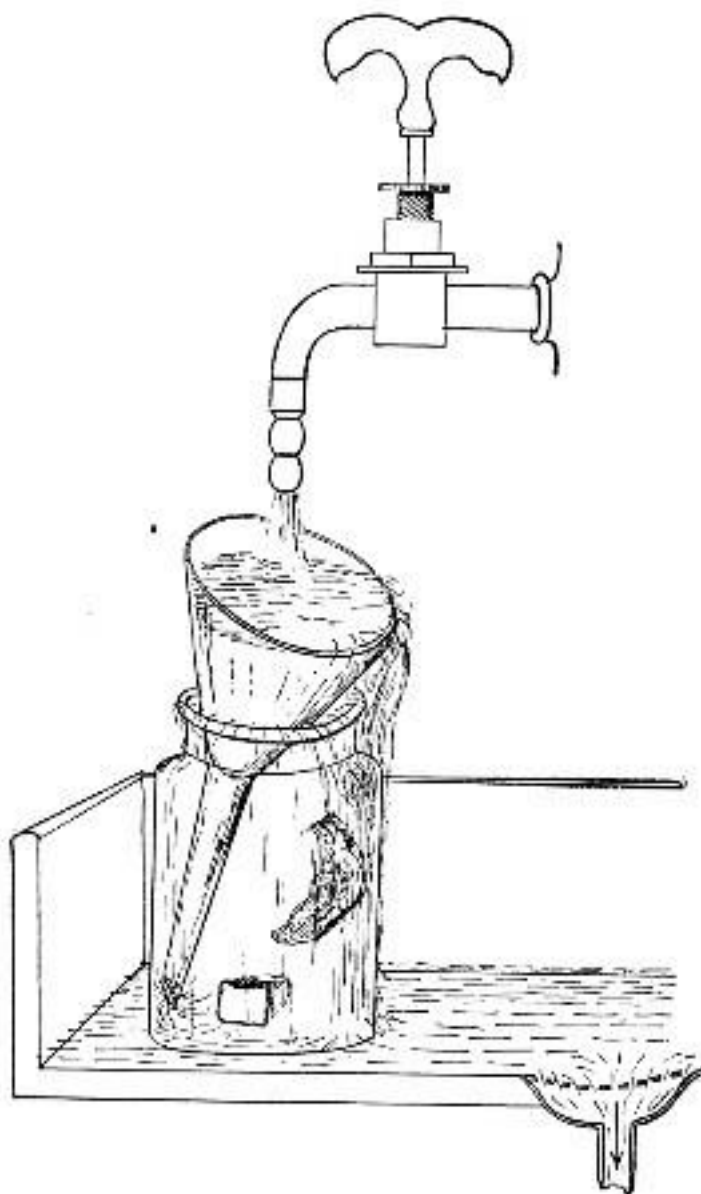


Рис. 71. Салфетки для стирки.

Примечание.—Если нет необходимости в резке немедленно, затвердевшие ткани можно хранить в 75-процентном спирте. спирт.

3. Удалите спирт с салфеток, выдержав их в воде от одного до двух часов. Выньте пробку из бутылки; поместите стеклянную воронку в открытое горлышко и опустите под струю проточной воды. Вода, конечно, переливается через край, но салфетки остаются во флаконе (рис. 71).

4. Пропитайте ткани слизью на двенадцать-двадцать четыре часа, в зависимости от размера. Переложите кусочки ткани во флакон со стерилизованной жевательной резинкой.

Формула.—

Гуммиарабик	5 грамм
Сахарозы	1 грамм
Борной кислоты	1 грамм

Воды 100 гр.

5. Поместите ткань на пластину замораживающего микротомы (возможно, лучшая форма - Cathcart's), покройте и окружите свежей жевательной резинкой; заморозьте эфиром или, для предпочтения, углекислым газом и сделайте срезы.

6. Срезанные с ножа кусочки переложите в стеклянную посуду с теплой водой и оставьте примерно на час, чтобы жвачка растворилась.

(Если не требуется сразу, храните в 90%-ном количестве. спирта.)

7. Перенесите в стеклянную капсулу, содержащую выбранную окрашивающую жидкость, с помощью секционного подъемника.

8. Перенесите срезы по очереди в капсулы, содержащие абсолютный спирт (для обезвоживания), и в капсулы, содержащие ксилол или гвоздичное масло (для очистки).

9. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

Альтернативный экспресс—метод.-

1. Нарезьте очень маленькие кусочки ткани.

2. Зафиксируйте в 10%-ном формалине. водный раствор (жидкость для фиксации № 7, стр. 82) в течение 24 часов.

3. Перенесите блок на пластину замораживающего микротомы и заморозьте парами углекислого газа.

4. Снимите срезы с ножа в стеклянную посуду с теплой водой.

5. Поместите срезы в стеклянные капсулы с выбранными красителями.

6. Поместите окрашенный участок в посуду с чистой водой и вставьте предметное стекло наклонно под участок; с помощью установленной иглы наденьте участок на предметное стекло и удерживайте его там; осторожно извлеките предметное стекло из воды, следя за тем, чтобы все складки на участке расплылись, прежде чем предметное стекло будет окончательно извлечено из воды.

7. Слейте из секции как можно больше воды. Капните на секцию абсолютный спирт из бутылочки, чтобы обезвожить ее.

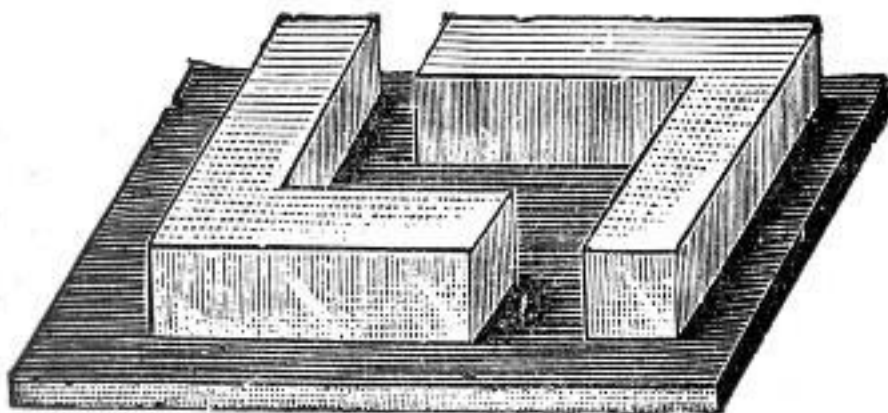
8. Сложите вдвое лист промокательной бумаги и аккуратно прижмите его к участку, чтобы высушить.

9. Добавьте ксилол, чтобы очистить участок.

10. Нанесите на срез большую каплю ксилолового бальзама и осторожно опустите на него защитное стекло.

ПАРАФИНОВЫЙ МЕТОД.

1. **Фиксация.** Поместите кусочки ткани, лежащие на вате, в стеклянную бутылку с широким горлышком. Налейте достаточное количество едкой сублиматной фиксирующей жидкости; оставьте ткань в ней на двенадцать-двадцать четыре часа в зависимости от размера.
2. Слейте фиксирующую жидкость и тщательно промойте в проточной воде в течение двадцати минут-получаса, чтобы удалить излишки едкого сублимата.



формы.

Рис. 72.Г—образные латунные

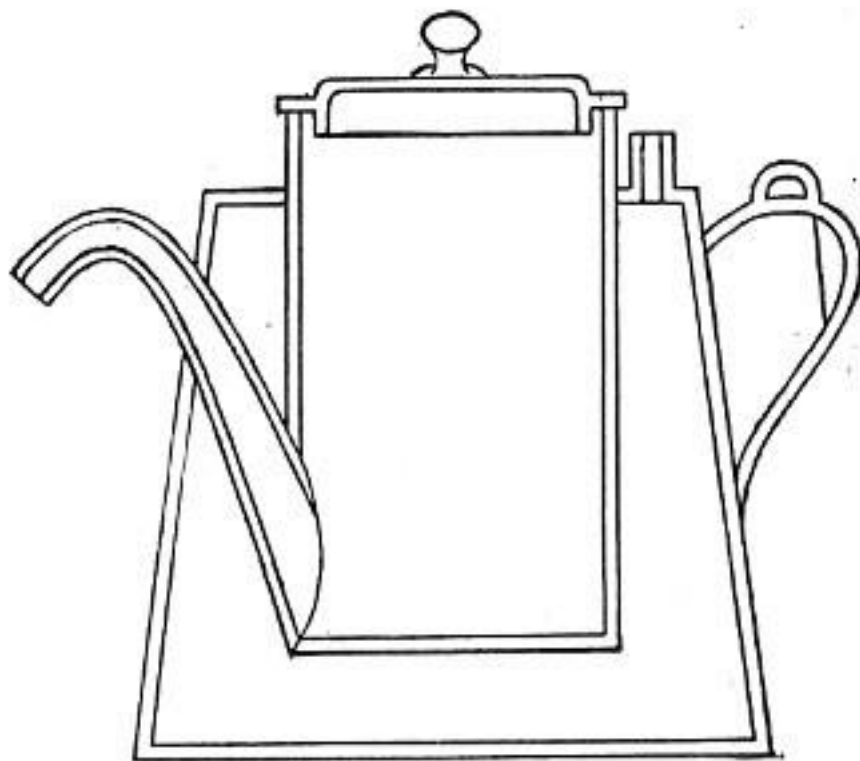


Рис. 73. Чайник для парафина.

3. **Упрочнение.** Помещайте салфетки по очереди в спирт каждой из следующих крепостей на срок от двенадцати до двадцати четырех часов: 50-процентный, 75-процентный, 90-процентный, абсолютный.

4. **Обезвоживание** осуществляется путем погружения тканей в свежий абсолютный спирт.

5. **Очистка.** Наполовину заполните хлороформом бутылку с широким горлышком. На поверхность хлороформа нанесите слой абсолютного спирта глубиной от пяти до десяти миллиметров. Поместите кусочки ткани в слой спирта, и когда они пропитаются этим слоем, перенесите их в чистый хлороформ на срок от шести до двадцати четырех часов в зависимости от размера кусочков. Когда ткань "очищается", она становится более или менее прозрачной.

6. **Проникновение.** Поместите очищенные салфетки в свежий хлороформ с несколькими кусочками парафина и выдержите в теплом месте, например, на крышке теплого инкубатора. Тепло постепенно расплавляет парафин, и салфетки должны оставаться в смеси около двадцати четырех часов.

7. Перенесите салфетки в сосуд, содержащий чистый расплавленный парафин. Поместите этот сосуд на водяную баню с парафином, температуру которой регулируют на 2°C выше температуры плавления используемого парафина, и дайте тканям пропитаться примерно на четыре-шесть часов, чтобы обеспечить полную пропитку. Используемый парафин должен иметь температуру плавления не более 58°C . Для всех обычных целей 54°C будет сочтено вполне достаточным.

8. Заливаем свежий парафин в металлическую (или бумажную) форму.

(a) Разложите пару металлических кусочков **L**-образной формы на стеклянной пластине, чтобы получился прямоугольный желоб (рис. 72).

(b) Вылейте в форму свежий расплавленный парафин из специальной емкости (рис. 73).

(c) достаньте кусочек ткани из парафиновой ванночки и выложите его в форму.

(d) Осторожно подуйте на поверхность парафина в форме, и как только образуется пленка твердого парафина, осторожно поднимите стеклянную пластину, на которую установлена форма, и опустите пластину вместе с формой в таз с холодной водой.

(e) Когда брусочек остынет, отломите металлические **буквы**; ножом сотрите излишки парафина с ткани, стараясь сохранить прямоугольную форму, и храните брусочек в коробочке из-под таблеток.

Когда необходимо вложить несколько кусочков ткани одновременно, чрезвычайно полезными окажутся формы из прочной меди площадью 10 см, 5 см и 2,5 см соответственно и глубиной 0,75 см (рис. 74). Они, помещенные на стеклянные пластины, заменяют пару букв "Л" в описанном выше процессе. Когда парафин застынет, винт *a* следует ослабить, чтобы позволить двум половинкам фланца *b* слегка разъехаться — это облегчает снятие парафинового блока.

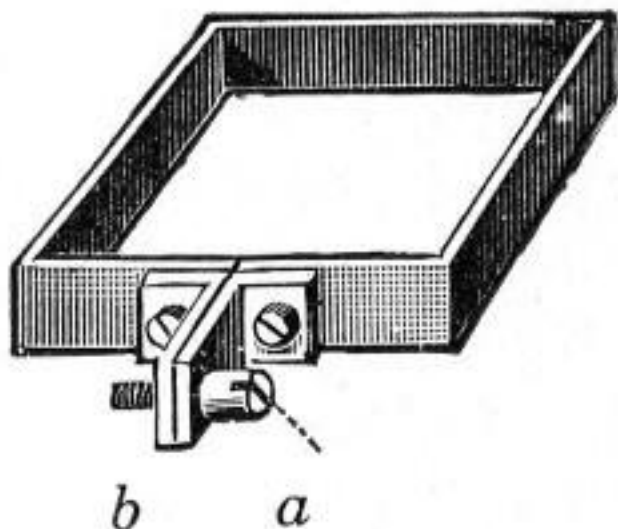


Рис. 74. Парафиновая форма.

8. Зацементируйте блок на носителе "парафинового" микротом (Minot, Jung или Cambridge Rocker) небольшим количеством расплавленного парафина. Большая безопасность достигается, если парафин вокруг основания блока расплавляется с помощью горячего металлического или стеклянного стержня.

9. Нарежьте ломтики — тонкие и, по возможности, в виде лент.

Монтаж парафиновых секций.—

1. Нанесите большую каплю на 30%. нанесите спирт на центр предметного стекла (или накладного стекла) и поместите секцию на поверхность капли с помощью подъемника для секций.

2. Держите предметное стекло в пальцах одной руки и осторожно прогревайте над пламенем горелки Бунзена, время от времени прикасаясь к нижней поверхности стекла тыльной стороной другой руки. Как только предметное стекло станет ощутимо теплым на коже, парафиновый срез разгладится и все морщинки исчезнут.

(Предметное стекло с плавающей на нем деталью можно поддерживать на поверхности парафиновой ванны в течение двух-трех минут, вместо того чтобы нагревать над пламенем, как описано здесь.)

3. Осторожно наклоните предметное стекло и промокните излишки спирта промокательной бумагой, оставив часть прикрепленной к центру предметного стекла.

4. Поместите предметное стекло на решетку (рис. 75) сечением вниз в "горячий" инкубатор на двенадцать-двадцать четыре часа. По истечении этого времени срез прочно приклеивается к стеклу и обрабатывается на последующих этапах как "фиксированная" защитная пленка для стекла.

Примечание.—Если необходимо обработать большие толстые срезы, или если важно время, или в процессе окрашивания используются кислоты, часто рекомендуется добавить небольшое

количество альбумина Майера в спирт, прежде чем выплавлять срез. Если использовать это вещество, то пребывания от двадцати минут до получаса в "горячем" инкубаторе будет достаточно для обеспечения прочного прилипания среза к предметному стеклу. Белковую жидкость готовят следующим образом:

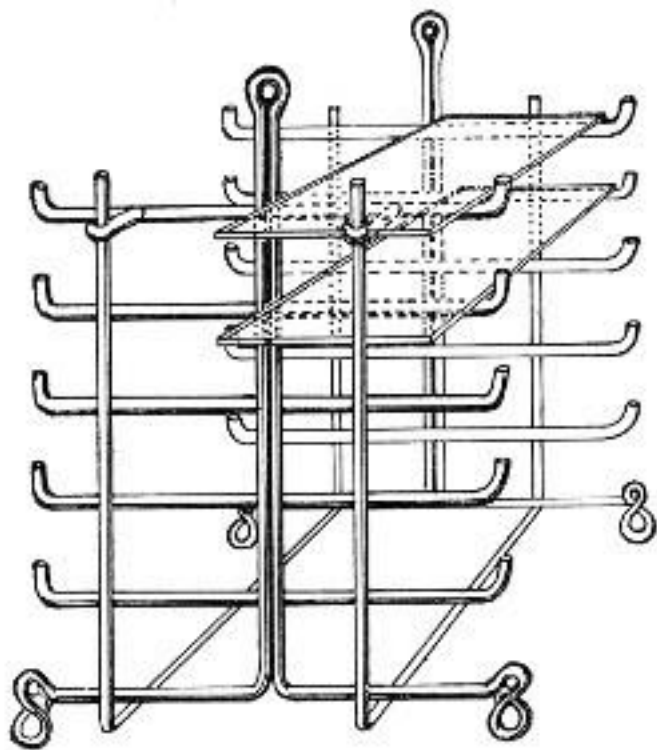


Рис. 75.—Секционный стеллаж.

Альбумин Майера.—

Взвесить

Салицилат соды 1 грамм

и раствориться в

Глицерин 50 г/л

Добавить

Яичный белок 50 гр.

Тщательно перемешайте с помощью яичного венчика.

Перелейте в чистую бутылку.

В качестве альтернативного метода нанесите тонкий слой раствора Шаллибаума на предметное стекло карандашом из верблюжьей шерсти; аккуратно положите срез на эту пленку и слегка нагрейте, чтобы закрепить срез.

Решение Шаллибаума:

Гвоздичное масло 30 гр.

Коллодий 10 гр.

Хранить в темно-синей бутылке в прохладном месте.

Окрашивание парафиновых срезов.—

1. Разогрейте парафиновый срез над пламенем Бунзена, чтобы размягчить (*но не расплавить*) парафин, затем растворите воск ксилолом, налитым из бутылочки.
2. Удалите ксилол, промыв участок спиртом.
3. Если ткань изначально "фиксировалась" в агрессивном сублиматном растворе, теперь срез необходимо обработать раствором йода Люголя на две минуты и затем погрузить в 90-процентный раствор. спирт для удаления всех следов желтого окрашивания.
4. Промойте в воде.
5. Нанесите глубокое окрашивание, если используете однократное окрашивание, так как последующие процессы обесцвечивают.
6. Промойте в воде, при необходимости обесцветьте.
7. Залейте несколько раз абсолютным спиртом, чтобы обезвожить секцию.
8. Очистить от ксилола. (Гвоздичное масло обычно не используется, поскольку оно обесцвечивает срез.)
9. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ СРЕЗОВ.

Двойное окрашивание кармином и по Граму-Вейгерту.-

1. Подготовьте участок для окрашивания, как указано выше, разделы 1-3.
2. Окрашивайте кармином лития (Orth's) или пикрокармином в течение десяти-тридцати минут в фарфоровой посуде для окрашивания (рис. 76).
3. Промойте в растворе пикриновой кислоты до желтого цвета. На этой стадии ядра клеток красные, протоплазма желтая, а бактерии бесцветные.

Раствор пикриновой кислоты готовят путем смешивания

Пикриновая кислота, насыщенный водный раствор	40°с
Соляная кислота	1°с
Спирт (90%)	160°с

4. Промойте в воде.

5. Промойте в спирте.
6. Окрашивание анилиновым горечавчато-фиолетовым.
7. Промыть в растворе йода до темно-коричневого или черного цвета.
8. Промойте в воде.
9. Окуните на секунду в абсолютный спирт.
10. Обесцвечивайте анилиновым маслом до полного исчезновения цвета.

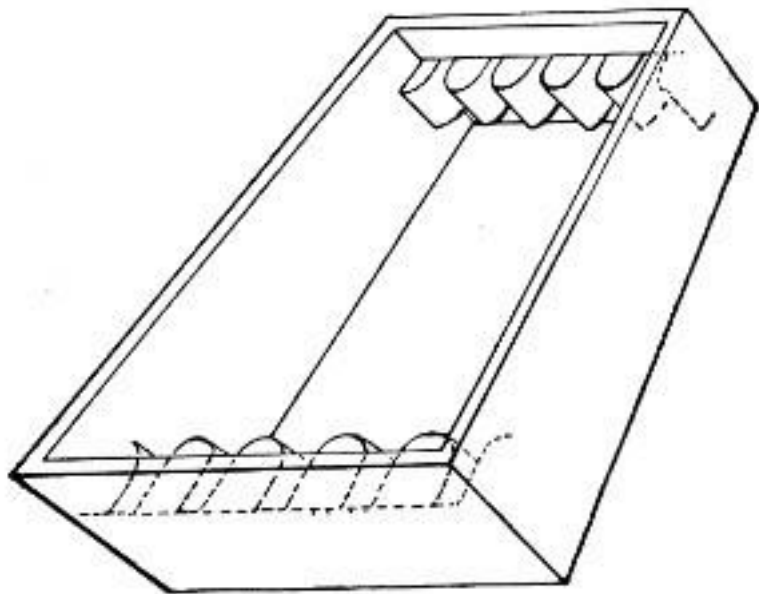


Рис. 76. Горшок для окрашивания.

11. Промыть анилиновым маслом, 2 части, ксилолом, 1 часть.
12. Очистить с помощью ксилола.
13. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

Альтернативный метод Грама-Вейгерта для срезов.—

1. Закрепите парафиновый срез на предметном стекле и подготовьте к окрашиванию обычным способом.
2. Пропитайте квасцы кармином примерно на пятнадцать минут.
3. Тщательно промойте в воде.
4. Процедите раствор анилиновой горечавки фиолетовой на участок на предметном стекле и оставьте окрашиваться примерно на двадцать пять минут.
5. Тщательно промойте в воде.
6. Обрабатывайте йодом Люголя до тех пор, пока срез не перестанет становиться чернее.
7. Тщательно промойте в воде.

8. Обработайте смесью из равных частей анилинового масла и ксилола до полного исчезновения цвета.

9. Тщательно промойте ксилолом.

10. Быстро обесцвечивайте и обезвоживайте абсолютным спиртом до тех пор, пока не останется лишь очень слабый голубоватый оттенок.

11. Очистить с помощью ксилола.

12. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

(Тогда фибрин и гиалиновая ткань окрашиваются в темно-синий цвет, в то время как бактерии, "окрашивающие грамм", приобретают глубокий сине-фиолетовый цвет.)

Метод Унны-Паппенгейма.—

Пятно.—

Взвесьте и перемешайте

Метиленовый зеленый 0,15 грамма

пиронина 0,25 грамма

и раствориться в

Карболовая кислота 0,5%. водный раствор 78°с

Отмерить

Спирт 2,5 с.с. }

Глицерин 20,0 с.с. } и добавьте к пятну.

Способ.—

1. Приложите салфетку к вышеуказанному пятну на десять минут.

2. Дифференцировать и обезвоживать абсолютным спиртом.

3. Обвалять в ксилоле.

4. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

Для демонстрации капсул.—

1. *Метод Макконки.*—Окрашивать точно так же, как для защитных пленок (видео, стр. 100).

2. *Friedländer's Method.*—

Пятно.—

Горечавка фиолетовая, насыщенный спиртовой раствор 50°с

уксусной кислоты, ледяная

10°с

Дистиллированная вода

100 °с

Способ.—

1. Подготовьте срезы к окрашиванию, *secundum artem*.
2. Окрашивайте срезы в тепле (*например*, в горячем инкубаторе) в течение двадцати четырех часов.
3. Смойте водой.
4. Слегка обесцветьте 1%-ной уксусной кислотой.
5. Быстро обезвоживайте абсолютным спиртом.
6. Очистить с помощью ксилола.
7. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

Для демонстрации кислотостойких бацилл.-

1. Подготовьте срезы к окрашиванию обычным способом.
2. Окрашивайте раствором гематина от десяти до двадцати секунд, чтобы получить чистое ядерное окрашивание; затем промойте водой.
3. Окрашивайте карболовым фуксином двадцать-тридцать минут при температуре 47 ° С; затем промойте в воде.
4. Обработайте гидрохлоридом анилина, 2%. водным раствором, в течение двух-пяти секунд.
5. Обесцвечивать в 75-процентном растворе. спирт, пока на участке не появится пятно — от пятнадцати до тридцати минут.
6. Дегидратируйте абсолютным спиртом.
7. Очень быстро очистите ксилолом.
8. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.

Для демонстрации спирохет в тканях.

Метод пиридина (Левадити).—

1. Нарезьте кусочки ткани толщиной 1 мм.
2. Настаивайте в 10-процентном растворе. формалина в течение двадцати четырех часов.
3. Промойте в воде в течение одного часа.
4. Залейте 96-процентным спиртом. настаивайте сутки.

5. Отмерьте в темно-зеленую или янтарную бутылку 100 г 1-процентного раствора нитрата серебра и 10 г пиридина puriss. Переложите туда кусочки ткани. Закройте и держите при комнатной температуре три часа, затем в термостате при температуре 50 ° C в течение четырех-шести часов.

6. Быстро промойте в 10-процентном растворе. раствор пиридина.

7. Восстановите содержание серебра, поместив кусочки ткани в следующий раствор на сорок восемь часов.

Пирогалловая кислота	4 грамма
Ацетона	10 грамм
Пиридина puriss	15 грамм
Дистиллированной воды	100 грамм

8. Хорошо промойте в воде.

Настаивайте спирты возрастающей крепости до абсолютной, выдерживая в каждой крепости в течение двадцати четырех часов.

9. Очистить, вложить, нарезать очень тонкими ломтиками, закрепить, удалить парафин, снова очистить и закрепить в ксилоловом бальзаме.

Спирохеты, если они присутствуют, черные и выделяются на бледно-желтом фоне.

Слабый карболфуксин, нейтральный красный или толуидиновый синий также можно использовать для окрашивания фона, при желании, после удаления парафина на этапе 9.

Для демонстрации простейших в разрезах (Лейшман).—

Необходимые реагенты:

Полихромная окраска Лейшмана.

Уксусная кислота 1 в водном растворе 1500 г.

Каустическая сода 1 в водном растворе 7000.

Дистиллированная вода.

1. Установите секцию, удалите парафин и залейте дистиллированной водой, как обычно (*видео*, стр. 121).

2. Слейте излишки воды.

3. Нанесите на участок разбавленный раствор Лейшмана (1 часть морилки, 2 части дистиллированной воды) и оставьте на пять-десять минут (пока ткань не приобретет темно-синий цвет).

4. Обесцвечивайте раствором уксусной кислоты до тех пор, пока не станут синими только зародыши (исследуйте срез влажным объективом с низким энергопотреблением).

5. Если цвет эозина слишком хорошо выражен, обработайте его раствором каустической соды до получения желаемого оттенка (как видно в объектив диаметром 1/6 дюйма).
 6. Промойте дистиллированной водой.
 7. Быстро обезвоживайте спиртом.
 8. Очистить с помощью ксилола.
 9. Обваляйте в ксилоловом бальзаме.
-

VIII. КЛАССИФИКАЦИЯ ГРИБОВ.

Для практических целей Грибы можно разделить на:

1. **Гименомицеты** (включая грибы и т.д.).
2. **Гифомицеты** (плесневые грибки).
3. **Бластомицеты** (дрожжи и торулы).
4. **Шизомицеты** (бактерии).

Примечание.— Раньше миксомицеты относились к грибам; теперь они признаны принадлежащими к царству животных и называются "мицетозои".

МОРФОЛОГИЯ ГИФОМИЦЕТОВ.

В начале учебы внимание студента направлено на различные непатогенные плесневые грибки и дрожжи не только для того, чтобы он мог овладеть необходимой техникой при выращивании безвредных организмов, но и потому, что именно эти виды являются одними из самых распространенных из тех, которые могут случайно загрязнить его будущие препараты.

Гифомицеты состоят из мицелия из коротких членистых стержней или "гиф", отходящих от оси или зародышевой трубки, которая развивается из споры. Дефисы — это-

(a) Питательный или погружной.

(b) Репродуктивный или воздушный.

Протоплазма этих клеток содержит гранулы, пигмент, масляные шарики и иногда кристаллы оксалата кальция.

Размножение.—Апикальное спорообразование —бесполое; зооспоры —половые.

Мукорины.—*Мукор* (рис. 77).—Обратите внимание на ветвящиеся нити — "мицелий" (a), "гифы" (b).

Обратите внимание на бесполое размножение.

1. Нить накала растет вверх. На его вершине образуется перегородка, затем появляется шаровидное вздутие — "спорагий" (d). Это обладает определенной оболочкой.
2. Из перегородки вырастает булавовидная масса протоплазмы - "колумелла" (c).

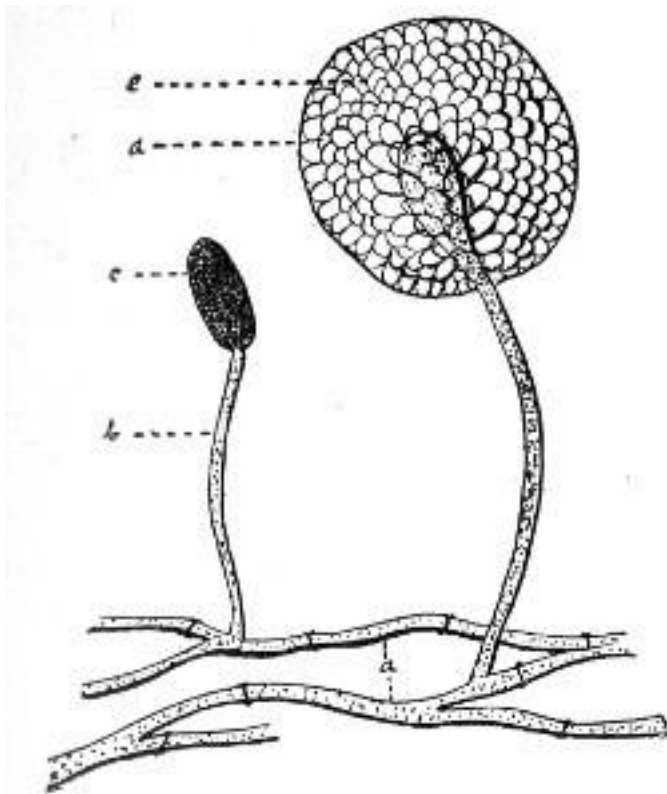


Рис. 77.—Мукор муседо.

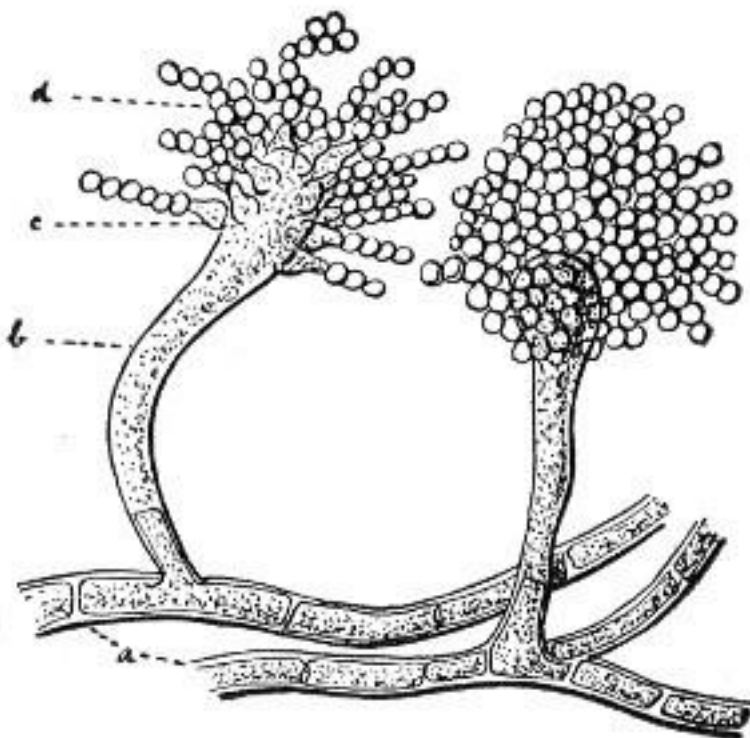


Рис. 78.Аспергилл

3. Остальная часть содержащейся протоплазмы распадается на "споры роя" (е).

В конце концов мембрана разрывается, и споры вылетают наружу.

Perisporaceae.—*Аспергиллус* (рис. 78).—Обратите внимание на ветвящиеся нити — "мицелий" (а).

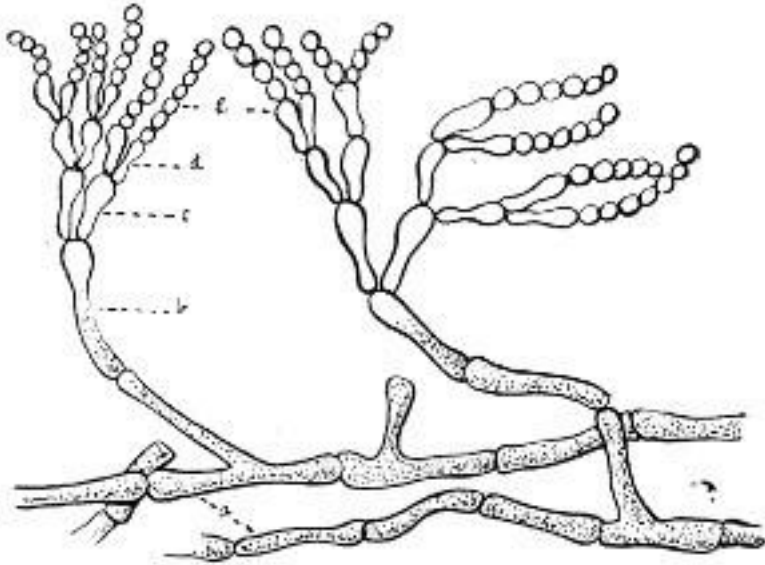


Рис. 79.—Пенициллин.

Обратите внимание на бесполое размножение.

1. Филамент (b) растет вверх, его окончание становится булабовидным; на булабовидном конце появляются колбовидные клетки - "стеригматы" (с).

2. На свободном конце каждой стеригмы образуется овальное тело — спора или "гонидий" (d), который при созревании отделяется от стеригмы. На каждой стеригме могут располагаться два или более гонидий.

Пенициллий (рис. 79).—Обратите внимание на ветвящиеся нити — "мицелий" (а) (часто содержащий шарики).

Обратите внимание на бесполое размножение.

1. Нить растет вверх — "гониодофор" (b) — и ее вершина делится на несколько ветвей — "базидии" (с).

2. На вершине каждого базидия появляется ячейка в форме колбы, "стеригма" (d).

3. На вершине каждой стеригмы появляется ряд овальных клеток — "спор" или "конидий" (е). Они, когда созреют, отделяются от стеригмата.

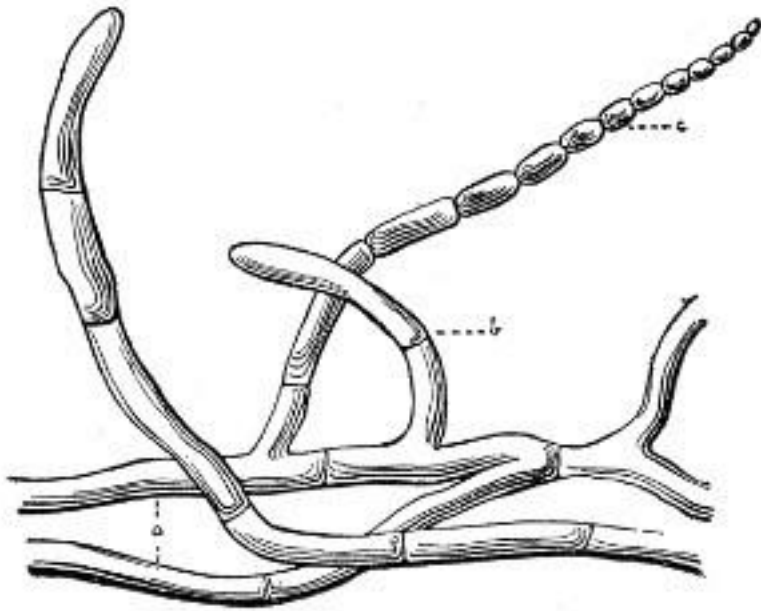


Рис. 80.—Оидиум.

Ascomycetae.—*Oidium* (рис. 80).—(Это семейство, возможно, так же близко связано с бластомицетами, как и с гифомицетами.)

Обратите внимание на ветвящиеся нити — "псевдомицелий" (а). Кое-где нити расщепляются на своих концах на овальные или палочковидные сегменты, "оидии", и ведут себя как споры.

Обратите внимание на бесполое размножение. Из псевдомицелия возникают настоящие гифы (b), каждая из которых, в свою очередь, заканчивается цепочкой спор (с).

МОРФОЛОГИЯ БЛАСТОМИЦЕТОВ.

Бластомицеты состоят из сферических или овальных клеток (от 8 до 9,5 мкм в диаметре), которые при быстром размножении почкованием могут образовывать ложный мицелий. Тонкая клеточная стенка окружает зернистую протоплазму, в которой можно заметить вакуоли и иногда ядро. Последнее лучше всего видно при окрашивании гематоксилином (см. стр. 105).

В процессе своего роста и размножения бластомицеты расщепляют растворы, содержащие сахар, на спирт и CO_2 .

Saccharomyces (рис. 81).— Обратите внимание на круглые или овальные клетки гранулярной протоплазмы (а), содержащие твердые частицы и вакуоли (с) и окруженные определенной оболочкой.

Размножение.—Почкованием; аскоспоры —бесполые.

Обратите внимание на бесполое размножение.

1. "Геммирование" — то есть отпочковывание дочерних клеток (b) из различных частей постепенно увеличивающейся материнской клетки. В конце концов они отделяются и, в свою очередь, становятся материнскими клетками и образуют новые группы почек.

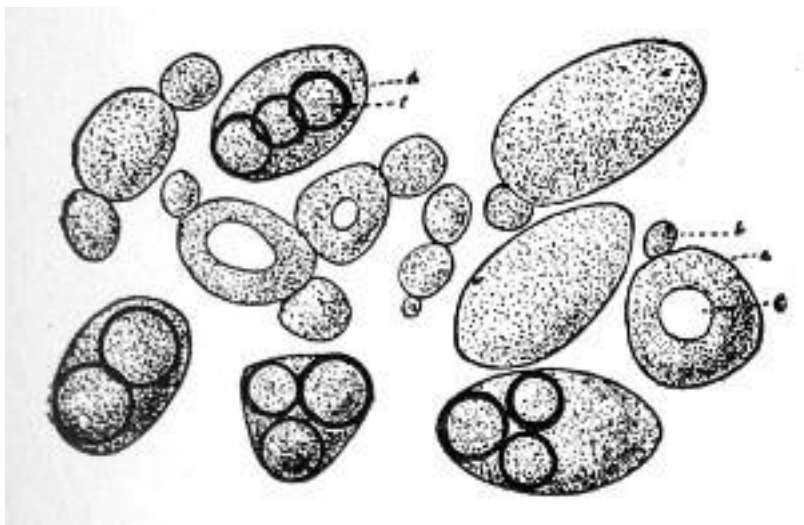


Рис. 81. Сахаромицеты с аскоспорами.

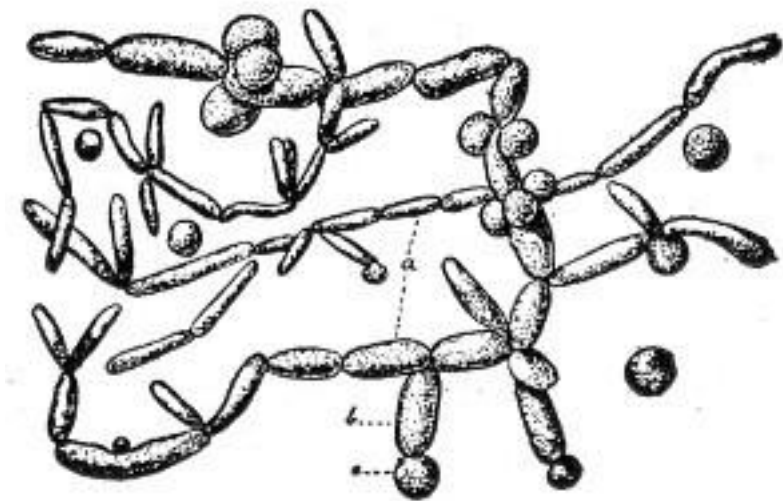


Рис. 82.—Торула.

2. Спорообразование — "аскоспоры" (е). Они образуются при определенных температурах и в течение четко определенных периодов; *например*, у *Saccharomyces cerevisiae* - тридцать часов при температуре от 25° до 37°С или десять дней при 12°С.

Торулы (рис. 82).—Торулы, хотя и напоминают дрожжи почти во всех других отношениях, никогда не образуют эндоспор. Обратите внимание на удлиненные клетки в форме сосисок (а), более крупные овальные клетки (b) и шаровидные клетки (с). Первые два часто переплетаются и растут в виде пленки.

Обратите внимание на отсутствие образования аскоспор.

IX. ШИЗОМИЦЕТЫ.

Классификация и морфология.—Бактерии часто классифицируют в общих чертах в соответствии с их жизненными функциями на—

Сапрогенные, или гнилостные бактерии;
Зимогенные, или ферментирующие бактерии;
Патогенные, или болезнетворные бактерии;

или в соответствии с их потребностями в пище в...

Прототрофный, не требующий органической пищи (*например*, нитрифицирующих бактерий);
Метатрофный, требующий органической пищи (*например*, сапрофиты и факультативные паразиты);
Паратрофный, требующий живой пищи (облигатные паразиты);

или в соответствии с продуктами их метаболизма в—

Хромогенные, или продуцирующие пигмент бактерии;
Фотогенные, или продуцирующие свет бактерии;
Аэрогенные, или продуцирующие газ бактерии;

и так далее.

Однако такие широкие группировки, как эти, имеют лишь небольшую практическую ценность применительно к систематическому изучению делящихся грибов.

С другой стороны, до сих пор не было составлено по—настоящему научной классификации шизомицетов, и различные морфологические признаки представителей семейства все еще используются в качестве основы для классификации, как недостаточно изученные.

1. Кокки. (Рис. 83).—Округлые или овальные клетки, разделенные в соответствии с расположением особей после деления на—

Диплококки и *стрептококки*, при которых деление происходит только в одной плоскости, а особи остаются прикрепленными (*a*) парами или (*b*) цепочками.

Тетрады, *мерисмопедии* или *педиококки*, при которых деление происходит попеременно в двух плоскостях под прямым углом друг к другу, а особи остаются прикрепленными в виде плоских таблеток по четыре или кратных им.

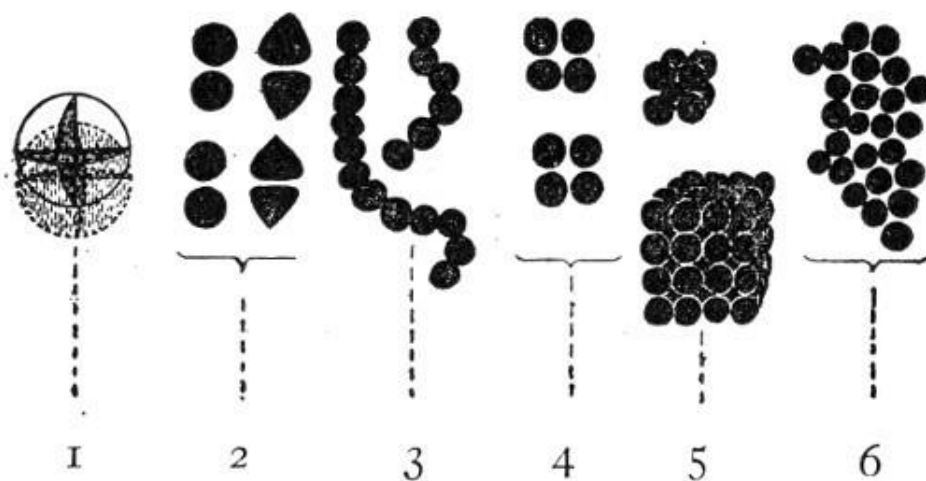


Рис. 83. Типы

бактерий—кокков: 1, диаграмма сферы, указывающая плоскости деления; 2, диплококки; 3, стрептококки; 4, тетрады; 5, сарцины; 6, стафилококки.

Сарцина, где деление происходит последовательно в трех плоскостях, и особи остаются прикрепленными в кубических пакетах по восемь штук и кратных им.

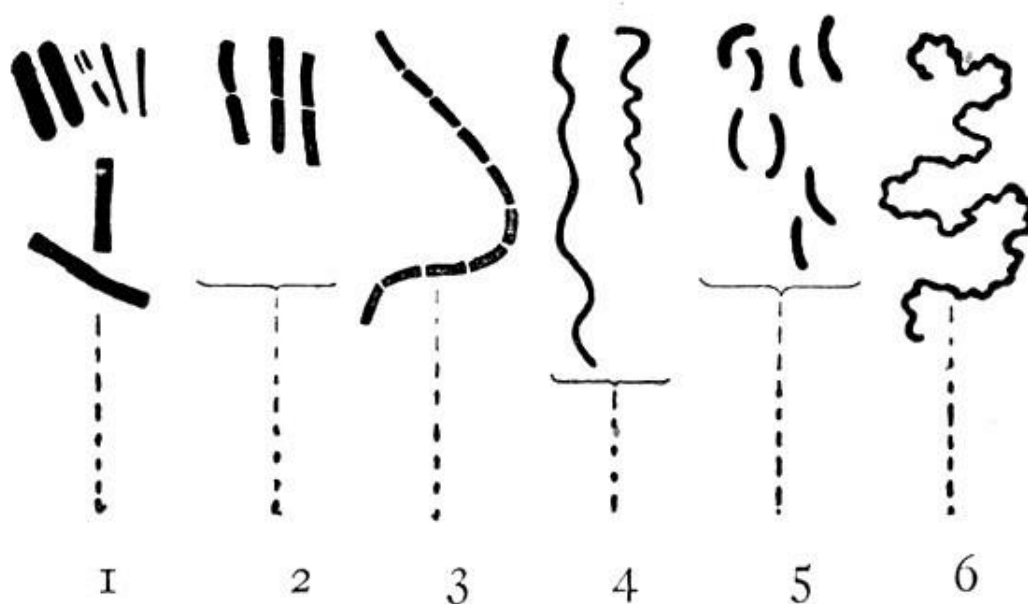


Рис. 84. Типы

бактерий—бациллы и др.: 1— бациллы; 2 - диплобациллы; 3 - стрептобациллы; 4 - спириллы; 5 - вибрионы; 6 - спирохеты.

Микрококки или *стафилококки*, у которых деление происходит в трех плоскостях, но без определенной последовательности; следовательно, особи остаются прикрепленными парами, короткими цепочками, пластинками по четыре, кубическими пакетами по восемь и неправильной формы массами, содержащими многочисленные кокки.

2. Бациллы (рис. 84, 1-3).—Палочковидные клетки. Бациллу, какой бы короткой она ни была, обычно можно отличить от кокка по тому, что две стороны параллельны. Некоторые бациллы после деления сохраняют характерное расположение и могут называться *диплобациллами* или *стрептобациллами*.

Leptothrix - это термин, который в прошлом широко использовался для обозначения длинной нити, но теперь ограничен такими формами, которые принадлежат к leptothriciae (*вид ниже*).

3. Спирилла (рис. 84, 4-6).— Изогнутые и скрученные нити. Классифицируется, в зависимости от формы, на—

Спириллум.

Вибрион (запятая).

Спирохета.

Многие спирохеты, по-видимому, принадлежат к царству животных и объединены в группу простейших; другие организмы, которым было дано это название, несомненно, являются бактериями.

Встречаются также высшие формы бактерий, которые обладают следующими характеристиками: Они прикрепленные, неразветвленные, нитевидные формы, проявляющие...

(a) Различие между основанием и вершиной;

(b) Рост, по-видимому, верхушечный;

(c) преувеличенный плеоморфизм;

(d) "псевдоответвление" от расположения ячеек; и классифицируются на-

1. Беггиотоа. } Формы свободного плавания, которые

2. Тиотрикс. } содержат гранулы серы.

3. Кренотрикс. }

4. Кладотрикс. } Эти формы не содержат

5. Лептотрикс. } гранулы серы.

6. Стрептотрикс. Группа, которая демонстрирует истинное, но не дихотомическое ветвление и содержит некоторые патогенные виды.

Морфология одной и той же бактерии может сильно различаться в разных условиях.

Например, при одном наборе условий исследование чистого культивирования бациллы может показать короткую овальную палочку в качестве преобладающей формы, в то время как другая культура той же бациллы, но выращенная в других условиях, может почти полностью состоять из длинных нитей. Это изменение морфологии известно как "плеоморфизм".

Вот некоторые из факторов, влияющих на плеоморфизм:

1. Состав, реакция и т.д. *питательной среды*, в которой растет организм.

2. *Атмосфера*, в которой это выращивается.

3. *Температура*, при которой оно инкубируется.

4. *Воздействие света*.

Различные аспекты анатомии, морфологии и физиологии бактерий, которым уделяется особое внимание на следующих страницах, должны быть изучены как можно тщательнее при приготовлении препаратов микроорганизмов, названных в связи с каждым из них.

АНАТОМИЯ.

1. *Капсула* (рис. 85, б). — желатиновая оболочка (вероятно, сходная по составу с муцином), окружающая каждый отдельный организм и предотвращающая абсолютный контакт между любыми двумя. У некоторых видов капсула (*например, у V. pneumoniae*) хорошо выражена, но она не может быть продемонстрирована у всех. В очень хорошо выраженных случаях желатинизации клеточной стенки отдельные клетки склеиваются вместе в однородную массу, к которой применяется термин "зооглия" (*например, Streptococcus mesenteroides*). У некоторых видов в капсуле хранятся красящие вещества или оксид железа.

2. *Клеточная стенка* (рис. 85, с). — защитная дифференцировка внешнего слоя клеточной протоплазмы; трудно продемонстрировать, но обработка йодом или солевым раствором иногда вызывает усадку клеточного содержимого — "плазмолиз" — и, таким образом, делает видимой клеточную стенку (*например, V. megatherium*), как показано на рис. 85. Окрашенные бациллы при исследовании в поляризационный микроскоп часто демонстрируют дважды рефрактивную клеточную стенку (*например, V. tuberculosis* и *V. anthracis*).

У некоторых высших бактерий клеточная стенка проявляет эту дифференцировку в заметной степени и образует твердую оболочку, внутри которой клеточная протоплазма свободно перемещается; и в процессе размножения клеточная протоплазма может вытесняться, оставляя пустую пробирку неизменной по форме.

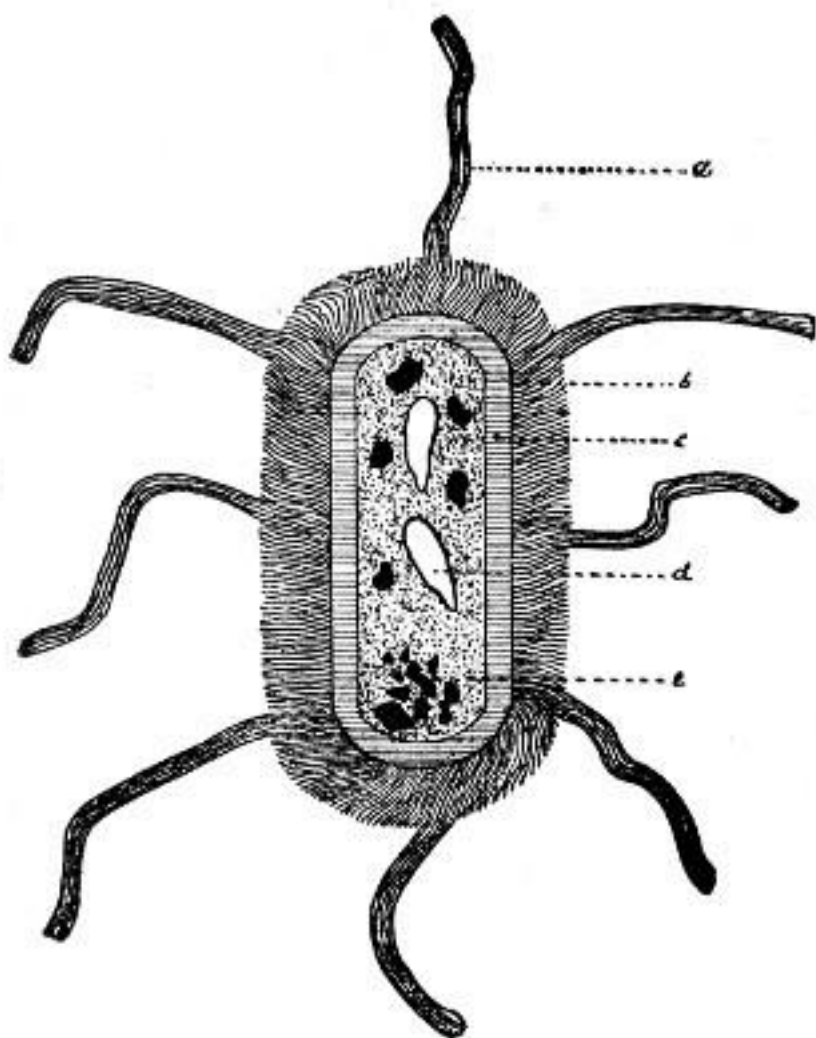


Рис. 85.— Графический эскиз составной бактерии для иллюстрации деталей анатомического строения.

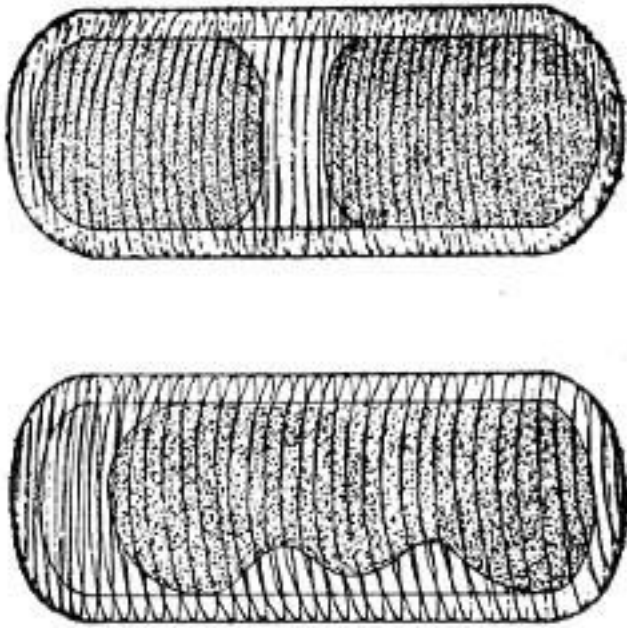


Рис. 86.—Плазмолиз.

3. *Содержимое клеток.*—Протоплазма (микопротеин) содержит высокий процент азота, но, как говорят, отличается от протеида тем, что не осаждается C_2H_6O . Обычно он однороден по внешнему виду — иногда гранулированный — и может содержать масляные шарики или вакуоли сока (рис. 85, *d*), гранулы хроматина и даже гранулы серы. Вакуоли сока следует отличать от спор, с одной стороны, и появления вакуума в результате плазмолиза, с другой.

Содержимое клеток иногда может дифференцироваться в пристеночный слой и центральное тело (например, *beggiatoa*) при окрашивании гематоксилином.

4. *Ядро.*—Существование этой структуры не было окончательно доказано, но у некоторых бактерий частицы хроматина наблюдались вблизи центра бактериальной клетки и более плотные массы протоплазмы, расположенные на полюсах, которые проявляют более выраженное сродство к анилиновым красителям, чем остальная клеточная протоплазма. Эти последние называются полярными гранулами или *Polkoerner* (рис. 85, *e*). Иногда эти скопления протоплазмы изменяют цвет поглощаемого ими красителя. Затем они известны как метахроматические тела или *Эрнста Кернера* (например, *B. diphtheriae*).

5. *Жгутики* (Органы передвижения, рис. 85, *a*).— Это студенистые удлинения клеточной протоплазмы (или, что более вероятно, капсулы), встречающиеся либо на одном полюсе, либо на обоих полюсах, либо разбросанные по всей периферии. Жгутики не являются псевдоподиями. Наличие жгутиков в свое время было предложено в качестве основы для системы классификации, когда были дифференцированы следующие типы скручивания (рис. 87):

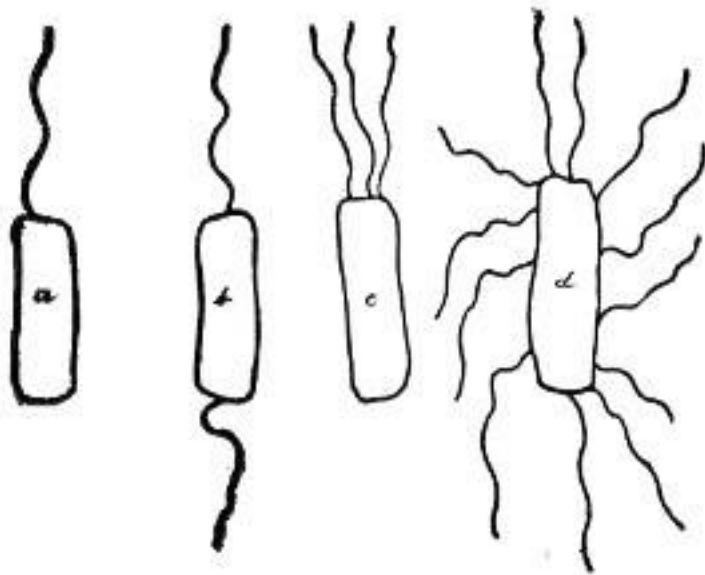


Рис. 87. Типы цилирования.

1. Полярный: (а) *Монотрихий* (единственный жгутик, расположенный на одном полюсе; например, *B. pycnosaneus*).

(б) *Амфитрихоз* (по одному жгутику на каждом полюсе; например, *Spirillum volutans*).

(с) *Лохотричный* (пучок жгутиков, расположенных на каждом полюсе; например, *B. cyanogenus*).

2. Диффузный: *Перитрихоз* (жгутики разбросаны по всей периферии, например, у *B. typhosus*).

ФИЗИОЛОГИЯ.

Размножение.—*Активная стадия.*—Вегетативный, т. е. путем деления клеток, или "деления".

1. Клетка становится удлиненной, а протоплазма агрегируется на противоположных полюсах.

2. На полпути между этими скоплениями происходит кольцевое сужение организма, и внутри клетки образуется перегородка под прямым углом к ее длине. (рис. 2).

3. Деление углубляется, перегородка делится на две пластинки, и, наконец, образуются две клетки.

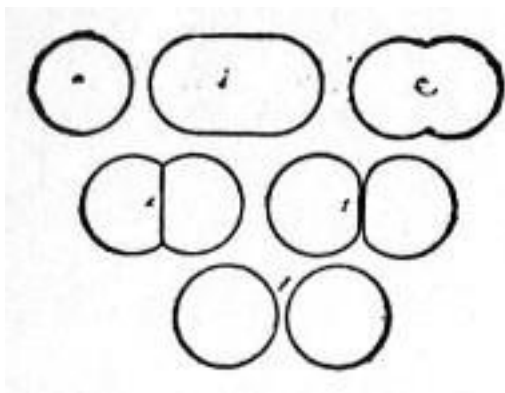


Рис. 88. Деление кокков.

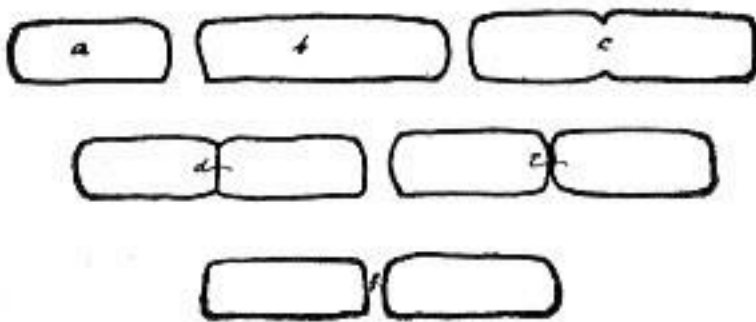


Рис. 89.—Деление бактерий.

4. Дочерние клетки могут оставаться объединенными студенистой оболочкой в течение переменного времени. В конце концов они разделяются и сами подразделяются.

Культуры на искусственных средах после выращивания в той же среде в течение некоторого времени — *т.е.*, когда запасы исчерпаны, — демонстрируют "формы инволюции" (рис. 90), хорошо иллюстрируемые культурами *B. pestis* на агаре двухдневной давности, *B. diphtheriae* на картофеле четырех-шестидневной давности.

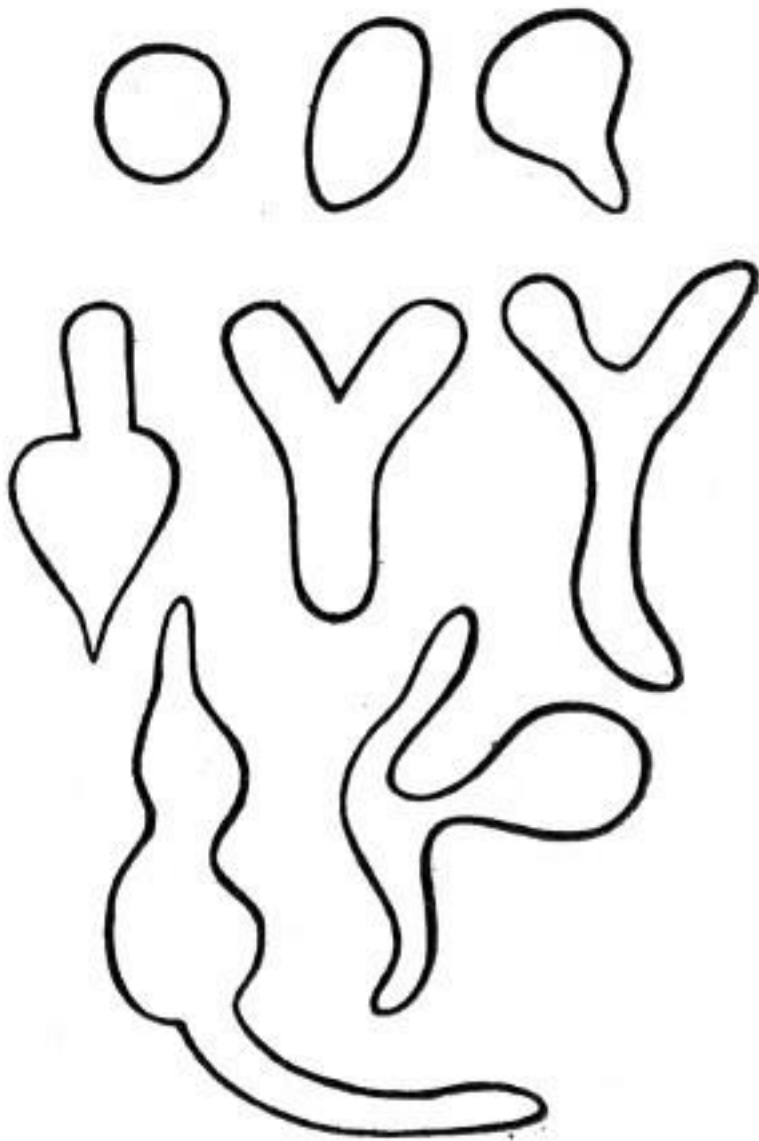


Рис. 90. Формы инволюции.

Они бывают двух классов, а именно:

(а) Формы инволюции, характеризующиеся изменением формы (рис. 90). (Не обязательно мертвый.)

(b) Формы инволюции, характеризующиеся потерей окрашивающей способности. (Всегда мертв.)

Стадия покоя.—Образование спор.—Условия, влияющие на образование спор: В старой культуре могут не остаться ничего, кроме спор. Раньше предполагалось, что споры *всегда* образуются, чтобы вид не вымер, когда

(а) Запас питательных веществ был исчерпан.

(b) Среда стала токсичной из-за накопления продуктов метаболизма.

(c) Окружающая среда стала неблагоприятной; *например*, изменение температуры.

Это не совсем верно; *е. г.*, температура, при которой споры лучше образуется постоянный для каждой бактерии, но варьируется в зависимости от различных видов; опять аэробам кислород требуется для спорообразования, но анаэробы не спорят в его присутствии.

(А) Артрогенный: отмечается только у микрококков. Один полноценный элемент, образующийся в результате обычного деления, дифференцируется для этой цели, увеличивается в размерах и образует плотную клеточную стенку. Одна или несколько ячеек в серии могут претерпеть это изменение.

Этот процесс, вероятно, является не настоящим спорообразованием, а просто относительным повышением устойчивости. Никогда не наблюдалось, чтобы эти так называемые артроспоры "прорастали", и при этом их устойчивость не была сильно выражена, поскольку они не могут инициировать новые культуры после десятиминутного воздействия температуры 80 ° С.

(Б) эндогенный: протоплазма клетки дифференцируется и конденсируется в сферическую или овальную массу (очень редко цилиндрическую). После дальнейшего сжатия наружные слои массы становятся еще более высокодифференцированными и образуют отчетливую мембрану споры, а сама спора теперь обладает высокой рефрактивностью. Было высказано предположение, и, по-видимому, на веских основаниях, что мембрана споры состоит из двух слоев: экзоспориума и эндоспориума. Каждая клетка образует только одну спору, обычно в середине, иногда на одном конце (однако зафиксированы некоторые исключения; *например, B. inflatus*). Форма родительской клетки может быть неизменной, как у бациллы сибирской язвы, или измененной, как у бациллы столбняка, и эти точки служат основой для классификации спороносных бацилл следующим образом:

(А) клеточное тело родительской бациллы неизменной формы (рис. 91, а).

(Б) измененная форма клетки родительской бациллы.

1. *Clostridium* (рис. 91, б): Стержень, раздутый в центре и ослабленный на полюсах; веретенообразная форма; *например, B. butyricus*.

2. *Клиновидные* (рис. 91, с): Стержни, слегка вздутые на одном полюсе и более или менее заостренные на другом; клиновидные.

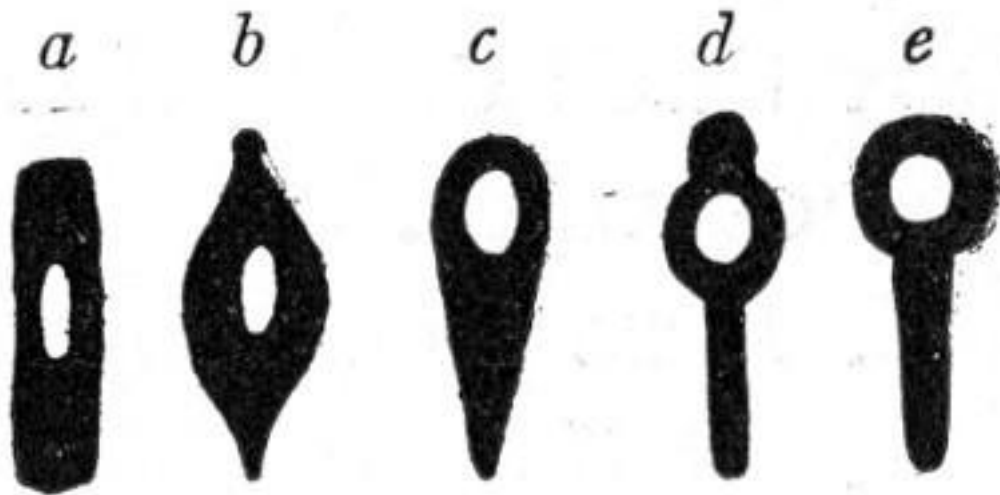


Рис. 91—Типы

спороносных бацилл.

3. *Ключица* (рис. 91, d): Стержни, раздутые на одном полюсе и цилиндрические (неизмененные) на другом; в форме замочной скважины; *например*, *B. chauvei*.

4. *Головчатые* (рис. 91, e): Стержни со сферическим расширением на одном полюсе; в форме голени; *например*, *B. tetani*.

Эндоспоры остаются внутри родительской клетки в течение определенного времени (в одном случае указано, что прорастание споры происходит внутри родительской клетки — "эндопрорастание"), но в конечном итоге высвобождаются в результате набухания и растворения клеточной мембраны родительской бациллы в окружающей жидкости или разрыва этой мембраны. Затем они представляют следующие характеристики:

1. Хорошо сформированные, плотные клеточные мембраны, из-за чего их чрезвычайно трудно окрашивать, но после однократного окрашивания их также трудно обесцветить.
2. Высокая рефрактичность, которая отличала их от вакуолей.
3. Более высокая устойчивость, чем у родительского организма, к таким смертельным воздействиям, как жара, иссушение, голод, время и т.д., При чем эта устойчивость обусловлена

(a) Низкое содержание воды в плазме споры.

(b) Низкая теплопроводность } мембраны споры.

(c) Низкая проницаемость }

Эта устойчивость несколько варьируется в зависимости от конкретного вида — *например*, некоторые споры могут выдерживать кипячение в течение нескольких минут, но практически все погибают, если кипячение продолжается в течение десяти минут.

Прорастание.—При пересадке на подходящую среду и помещении в благоприятные условия споры прорастают, обычно в течение двадцати четырех-тридцати шести часов, и последовательно претерпевают следующие изменения, которые могут наблюдаться в культурах с подвешиванием в теплом состоянии:

1. Медленно набухайте и увеличивайтесь в размерах за счет впитывания воды.

2. Теряют свою преломляемость.

3. На этой стадии может наблюдаться один из трех процессов (но конкретный процесс всегда постоянен для одного и того же вида):

(a) Из споры вырастает новая бацилла без разрушения мембраны споры (которая в данном случае теперь становится клеточной мембраной); *например, B. leptosporus*.

(b) Теряет свою споровую оболочку под действием раствора; *например, B. anthracis*.

(c) При разрыве он теряет свою споровую оболочку.

В этом процессе разрыв может быть либо полярным (только на одном полюсе, *например, у B. butyricus*), либо биполярным (*например, у B. sessile*), либо экваториальным (*например, у B. subtilis*).

В тех случаях, когда мембрана спор отбрасывается, клеточная мембрана новой бациллы может образоваться либо из—

(a) Внутренний слой мембраны споры, подвергшийся предварительному расщеплению на париетальный и висцеральный слои; *например, B. butyricus*.

(b) Внешние слои клеточной протоплазмы, которые дифференцируются для этой цели; *например, B. megatherium*.

Теперь новая бацилла увеличивается в размерах, удлиняется и переходит к вегетативному росту — т.е. подвергается делению, в результате которого образуются бациллы, которые, в свою очередь, могут давать начало спорам.

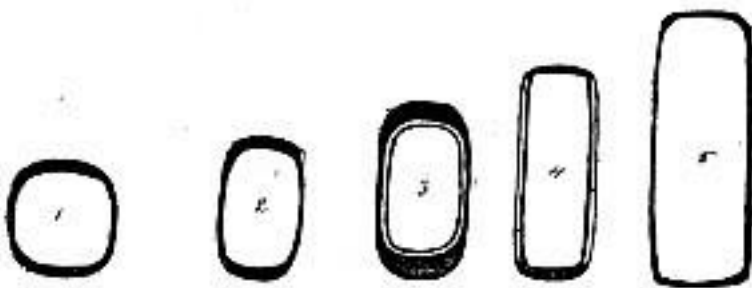


Рис. 92. Простой.

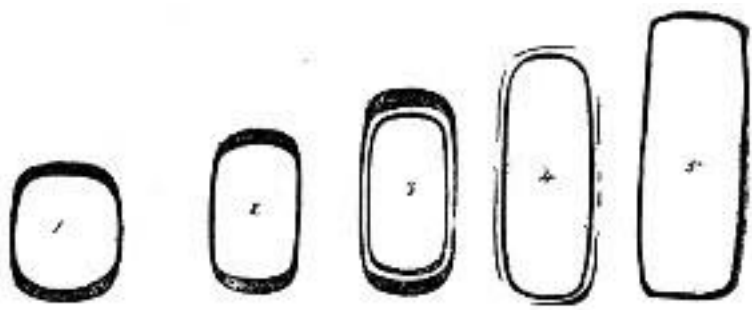


Рис. 93. Решение.

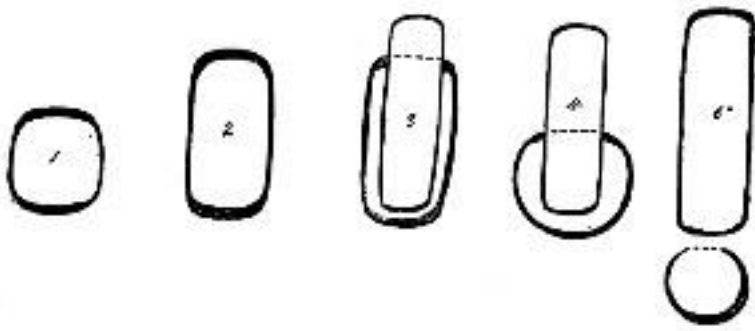


Рис. 94. Полярный.

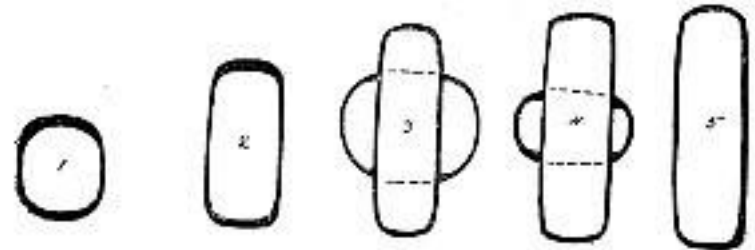


Рис. 95. Биполярный.

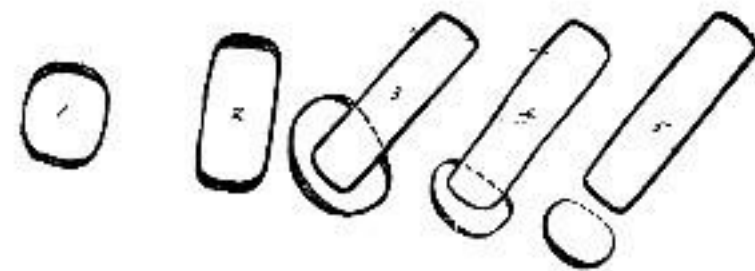


Рис. 96. экваториальный.

Продукты питания.-1. Органические продукты.—

(a) Чистые паразиты (*например, B. lepræ*) не будут жить вне живого тела.

(b) Как сапрофитные, так и факультативные паразитические бактерии сходятся в том, что им требуется неконцентрированная пища.

(c) Факультативные паразиты нуждаются в высокоорганизованной пище; *например, в протеидах* или других источниках азота и углерода, а также солях.

(d) сапрофитные бактерии легче культивировать; *например, ,*

1. Некоторые бактерии будут расти в почти чистой дистиллированной воде.

2. Некоторые бактерии будут расти в чистых растворах углеводов.

3. Вода абсолютно необходима для роста бактерий.

Для роста бактерий необходима пища определенной реакции. Как правило, рост наиболее активен в средах, которые реагируют на фенолфталеин слабнокислой реакцией, то есть

нейтральной или слабощелочной реакцией на лакмусовую бумажку. Рост плесени, с другой стороны, наиболее интенсивен в средах с сильной кислотностью по отношению к фенолфталеину.

Окружающая среда.— Влияние физических агентов на жизнь и рост бактерий сильно выражено.

1. *Атмосфера.*—Присутствие *кислорода* необходимо для роста некоторых бактерий, и при прекращении его подачи наступает смерть. Такие организмы называются *облигатными аэробами*.

Некоторые бактерии, по-видимому, одинаково хорошо размножаются независимо от того, получают они кислород или лишены его. Они называются *факультативными анаэробами*.

Третий класс будет жить и размножаться только тогда, когда доступ свободного кислорода будет полностью исключен. Они называются *облигатными анаэробами*.

2. *Температура.*—Практически не происходит роста бактерий при температуре ниже 5°C и очень незначительно выше 40°C. От 30°C до 37° С наиболее благоприятны для подавляющего большинства микроорганизмов.

Максимальная и минимальная температуры, при которых происходит рост, а также оптимальная, довольно постоянны для каждой бактерии.

Бактерии были классифицированы, в зависимости от их оптимальной температуры, на...

	Мин.	Опция.	Макс.
1. Психрофильные бактерии (в основном водные организмы)	0°C.	15°C.	30°C.
2. Мезофильные бактерии (включая патогенные бактерии)	15°C.	37°C.	45°C.
3. Термофильные бактерии	45°C.	55°C.	70°C.

Точка тепловой смерти организма - это еще одна биологическая константа; и это та температура, которая вызывает гибель вегетативных форм при продолжении воздействия в течение десяти минут (см. страницы 298-301).

3. *Свет.*—Многие организмы безразличны к присутствию света. С другой стороны, свет часто препятствует росту и изменяет в большей или меньшей степени биохимические характеристики организмов —*например*, хромогенность или способность к разжижению. Патогенные бактерии постепенно теряют вирулентность при культивировании в присутствии света.

4. *Движения.* Движения, если они незначительны и носят просто плавный характер, по-видимому, не оказывают вредного воздействия на рост бактерий; но сильное возбуждение, такое как встряхивание, абсолютно убивает их.

Состояние идеального покоя, по-видимому, наиболее благоприятно для роста бактерий.

Продукты метаболизма бактерий.—*Выработка пигмента.*—Многие микроорганизмы вырабатывают один или несколько ярких пигментов — желтый, оранжевый, красный, фиолетовый, флуоресцентный и т.д. — В процессе своей жизни и роста. Красящее вещество обычно существует в виде межклеточного выделяемого вещества. Однако иногда, по-

видимому, оно хранится фактически в телах бактерий. Таким образом, хромогенные бактерии классифицируются в соответствии с конечным назначением вырабатываемого ими красящего вещества на...

Хромопарные бактерии: у которых пигмент диффундирует в окружающую среду.

Хромофорные бактерии: у которых пигмент хранится в протоплазме клеток организма.

Парахромофорные бактерии: у которых пигмент хранится в клеточной стенке организма.

Различные виды хромогенных бактерий различаются по своим требованиям к окружающей среде для выработки характерных пигментов; *например*, некоторым нужны кислород, свет или высокая температура; другие, опять же, предпочитают обратные условия.

Производство света.—Некоторые бактерии, обычно полученные из воды, будь то пресной или соленой, проявляют заметную фосфоресценцию при культивировании в подходящих условиях. Они классифицируются как "фотогеничные".

Выработка ферментов.—Многие бактерии вырабатывают растворимые ферменты в процессе своего роста, о чем свидетельствует разжижение желатина, свертывание молока и т.д. Эти ферменты могут принадлежать к любому из следующих хорошо известных классов: протеолитические, диастатические, инвертиновые, сычужные.

Производство токсинов.—Большое количество, особенно патогенных бактерий, вырабатывают или выделяют ядовитые вещества, о которых имеется мало точных сведений, хотя многие из них, по-видимому, обладают ферментативным действием.

Эти токсины обычно подразделяются на...

Внеклеточный (или растворимый) Токсины: те, которые диффундируют в окружающую среду и удерживаются в растворе окружающей средой.

Внутриклеточный (или неразделимый) Токсины: токсины, которые настолько тесно связаны с протоплазмой клеток вырабатывающих их бактерий, что до настоящего времени не было разработано никаких средств для их разделения или экстракции.

Конечные продукты метаболизма.—В эту рубрику включены—

Органические кислоты (*например*, молочная, масляная и т.д.).

Щелочи (*например*, аммиак).

Ароматические соединения (*например*, индол, фенол).

Восстанавливающие вещества (*например, те, которые* восстанавливают нитраты до нитритов).

Газы (*например*, сероводород, диоксид углерода и т.д.).

И хотя обсуждение их образования и т.д. Выходит за рамки лабораторного руководства, методы, используемые для их обнаружения и разделения, входят в обычную рутинную работу и поэтому будут описаны (*вид стр. 276 и далее.*).

Х. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.

Для того, чтобы жизнь и рост бактерий можно было точно наблюдать в лаборатории, необходимо —

1. *Изолировать* отдельных представителей различных разновидностей микроорганизмов.
2. *Культивировать* выделенные таким образом организмы отдельно от других ассоциированных или загрязняющих бактерий — т.е. в *чистой культуре*.

Для успешного достижения этих целей необходимо предоставлять питательные вещества в форме, соответствующей потребностям конкретной бактерии или бактерий, находящихся под наблюдением, и в общих чертах можно сказать, что питательные вещества должны максимально приближаться по составу и характеру к естественным запасам организма.

Общие требования бактерий к их питанию уже были указаны (стр. 142), и время от времени на их основе изобреталось множество комбинаций белков и углеводов. Их вместе с различными растительными тканями, физиологическими или патологическими жидкостными выделениями и т.д. в совокупности называют *питательными средами* или *культуральными средами*.

Большая часть этих сред в основном является *жидкостью*, но из-за скорости, с которой бактериальный рост диффундирует через жидкость, в ней невозможно изучить характеристики отдельных организмов. Следовательно, многие такие среды впоследствии затвердевают за счет добавления таких веществ, как желатин или агар, в различных пропорциях, причем пропорции такого добавляемого материала обычно указываются при упоминании среды; *например*, 10% желатин, 2% агар. Желатин используется для затвердевания тех сред, которые он предназначен для культивирования бактерий при комнатной температуре или в "холодном" инкубаторе. В обычно используемых процентных соотношениях желатиновая среда становится жидкой при 25 °C; более высокие процентные соотношения остаются твердыми при несколько более высоких температурах, но сложность фильтрации крепких растворов желатина препятствует их общему использованию.

С другой стороны, среды, которые были затвердевшими при добавлении агара, становятся жидкими только при воздействии температуры 90° C в течение примерно десяти минут и снова затвердевают, когда температура падает до 40 °C.

Когда возникает необходимость сделать эти среды текучими, применяется тепло, после отвода которого они снова принимают свое твердое состояние. Такие среды следует называть *разжижаемыми средами*; однако на самом деле их обычно группируют вместе с твердыми средами.

Примечание.—Здесь должно быть указано, что обозначение 10% желатин или 2% агар относится только к количеству тех веществ, которые фактически добавляются в процессе производства, и не относится к процентному содержанию желатина или агара, в зависимости от обстоятельств, присутствующих в готовой среде; объяснение заключается в том, что используемые коммерческие продукты содержат большую долю нерастворимых веществ, которые отделяются фильтрованием во время приготовления разжижаемой среды.

Опять же, другие среды —*например*, картофель, сыворотка свернувшейся крови и т.д. - не могут быть повторно сжижены физическими средствами, и о них говорят как о *твердых* средах.

На следующих страницах подробно описан метод приготовления различных питательных сред при обычном использовании (см. также главу XI), те из них, которые лишь изредка требуются для более узкоспециализированной работы, сгруппированы вместе в главе XII. Необходимо исходить из того, что необходимо соблюдать scrupulous чистоту в отношении всего оборудования, сосудов, воронок и т.д., используемых при приготовлении сред; хотя на предварительных этапах приготовления большинства сред абсолютная стерильность используемого оборудования не является существенной.

МЯСНОЙ ЭКСТРАКТ.

Водный раствор экстрактивных веществ и т.д. нежирного мяса (обычно говядины) составляет основу нескольких питательных сред. Этот раствор называется "мясной экстракт", и опытным путем было определено, что его приготовление должно осуществляться путем экстрагирования половины килограмма влажного мяса одним литром воды. Однако для многих целей удобнее использовать более концентрированный экстракт; поэтому один килограмм мяса следует экстрагировать одним литром воды, чтобы получить мясной экстракт "Двойной крепости".

Когда-то было принято, да и сейчас в некоторых лабораториях принято использовать либо "говяжью голень", либо "бифштекс" - и то, и другое содержит мышечный сахар, который часто необходимо удалять перед приготовлением питательной среды. Предпочтение отдается сердечной мышце (сердцу вола или овцы), и с точки зрения экономичности, простоты и чистоты манипуляций, а также экстрактивной ценности импортные замороженные сердца волов обеспечивают наилучший экстракт.

Мясной экстракт (Флейшвассер) готовят следующим образом:

1. Отмерьте 1000 мл дистиллированной воды в большую колбу (или стеклянный стакан, или эмалированную железную кастрюлю) и добавьте 1000 граммов (примерно 2-1 / 2 фунта) свежего нежирного мяса —*например*, бычьего сердца, — мелко измельченного в мясорубке.
2. Осторожно подогрейте смесь на водяной бане, следя за тем, чтобы температура содержимого колбы не превышала 40°C в течение первых двадцати минут. (При этом растворяются растворимые протеиды, экстрактивные вещества, соли и т.д.)
3. Теперь доведите температуру смеси до точки кипения и поддерживайте при этой температуре в течение десяти минут. (При этом часть альбуминов, гемоглобина и т.д. Выпадает в осадок из раствора.)
4. Процедите смесь через стерильную масляную салфетку или перфорированную фарфоровую воронку, затем отфильтруйте жидкость через шведскую фильтровальную бумагу в стерильную "обычную" литровую колбу, а когда остынет, доведите температуру до 100°C путем добавления дистиллированной воды — для восполнения потерь при испарении.
5. Если нет необходимости стерилизовать мясной экстракт сразу, стерилизуйте мясной экстракт оптом в паровом стерилизаторе в течение двадцати минут каждый из трех дней подряд.

Мякоть телят, овцы или цыплят иногда заменяют говядиной; или мясной экстракт можно приготовить из внутренностей животных, таких как мозг, селезенка, печень или почки.

Примечание.—В качестве альтернативного метода 5 г мясного сока Brand's, или 3 г говяжьего сока Wyeth's, или 10 г мясного экстракта Либиха (Lemco) можно растворить в дистиллированной воде при температуре 100°С, затем нагреть и отфильтровать, как указано выше, до получения обычного мясного экстракта или мясного экстракта единственной крепости.

Среды, приготовленные из таких мясных экстрактов, однако, в высшей степени неудовлетворительны при использовании для культивирования более высокопаразитарных бактерий; хотя при работе в тропических и субтропических регионах их использование практически обязательно.

Реакция мясного экстракта.— Полученный таким образом мясной экстракт имеет кислую реакцию из-за присутствия кислых фосфатов калия и натрия, слабых кислот гликолевого ряда и органических соединений, в которых преобладает кислотный характер. Из-за природы веществ, с которыми он вступает в реакцию, общую кислотность мясного экстракта можно точно оценить только тогда, когда раствор находится при температуре кипения.

Более того, было замечено, что длительное кипячение (например, при приготовлении питательных сред) вызывает гидролитические изменения, которые повышают его кислотность, и **мясной экстракт становится стабильным в этом отношении только после того, как его выдерживали при температуре кипения в течение сорока пяти минут.**

Хотя мясной экстракт всегда реагирует кислотой с фенолфталеином, иногда он реагирует нейтрально или даже щелочно с лакмусом; и опять же, мясной экстракт, который стал абсолютно нейтральным по отношению к лакмусу, все еще реагирует кислотой с фенолфталеином. Это своеобразное поведение зависит от двух факторов:

1. Лакмусовая бумажка нечувствительна ко многим слабым органическим кислотам, на присутствие которых легко указывает фенолфталеин.
2. Двухосновный фосфат натрия, образующийся в процессе нейтрализации, представляет собой соль, которая щелочно реагирует с лакмусом, но нейтрально с фенолфталеином. Следовательно, для получения точной оценки реакции любого данного образца мясного экстракта важно, чтобы —

1. Мясной экстракт предварительно подвергните воздействию температуры 100°С в течение сорока пяти минут.
2. Оценка должна выполняться при температуре кипения.
3. В качестве индикатора следует использовать фенолфталеин.

Оценка проводится с помощью экспериментов по титрованию стандартных растворов каустической соды следующим образом:

Метод оценки реакции.—

Требуется оборудование:

Требуемые растворы:

бюретка с градуировкой в десятых долях сантиметра при температуре 1,25 °с.

2. пипетка объемом 1 ст.л., отмеренная в сотых долях и снабженная резиновой трубкой, нажимным краном и насадкой для подачи.

3. 25 °с. отмерьте (цилиндром или пипеткой, откалиброванными для 98 °С—не 15°С).

4. Несколько 60-градусных конических стаканов или колб Эрленмейера.

1. 10N NaOH, точно стандартизированный.

2. n/1 NaOH, точно стандартизированный

3. n/10 NaOH, точно стандартизированный

4. 0,5%. 50-процентный раствор фенолфталеина. спирт.

5. Белая фарфоровая чаша для выпаривания, наполненная кипятком и установленная над газовым пламенем в виде водяной бани.

6. Колба из богемского стекла, выполненная в виде бутылки для мытья и наполненная дистиллированной водой, которая постоянно кипит на треножной подставке.

Способ.—Расположите устройство так, как показано на рисунке 97.

(A) 1. Заполните бюретку n/10 NaOH.

2. Заполните пипетку n/1 NaOH.

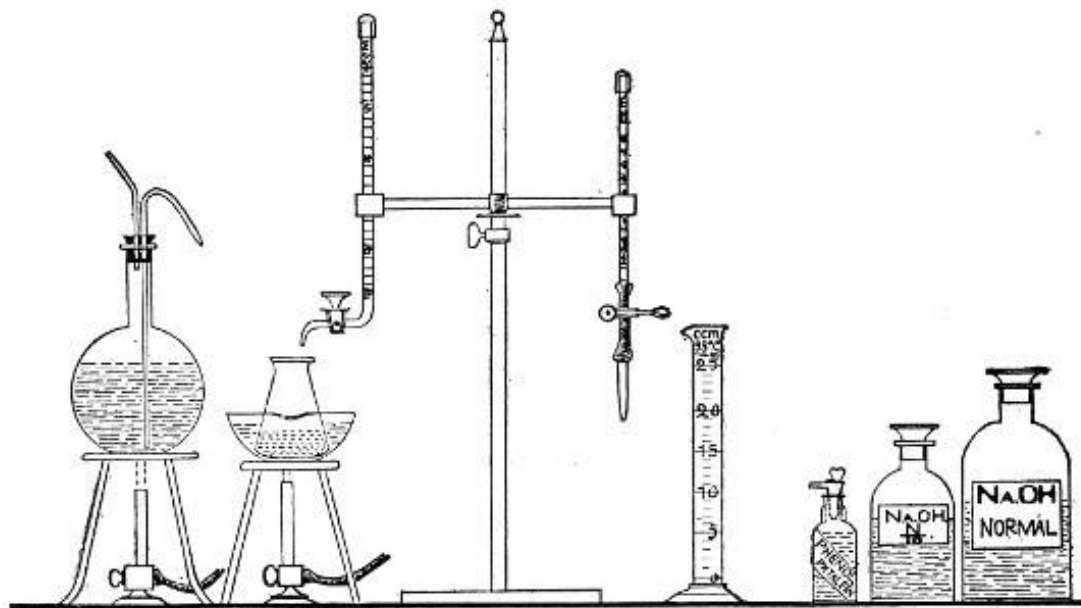


Рис. 97. Устройство

аппарата для титрования сред.

3. Отмерьте 25 г мясного экстракта (предварительно разогретого в пароварке при температуре 100 ° С в течение сорока пяти минут) в один из стаканов с помощью отмерителя; промойте отмеренное количество очень небольшим количеством кипящей дистиллированной воды из

промывочной бутылки, а затем добавьте эту промывочную воду к мясному экстракту, уже находящемуся в стакане.

4. Добавьте примерно 0,5 стакана раствора фенолфталеина, опустите стакан на водяную баню и доведите до кипения.

5. К среде в мензурке осторожно добавляйте $n/10$ NaOH из бюретки до достижения конечной точки, на что указывает появление розоватого оттенка, показанного на рисунке 98 (b). Обратите внимание на количество децинормального содового раствора, используемого в процессе.

Примечание.—Непосредственно перед достижением конечной точки в жидкости может быть отмечена очень слабая опалесценция из-за осаждения двухосновных фосфатов. После достижения истинной конечной точки дальнейшее добавление примерно 0,5 стакана децинормального раствора соды придаст насыщенный пурпурный цвет (рис. 98, c), который является так называемой "конечной точкой" Американского комитета бактериологов.

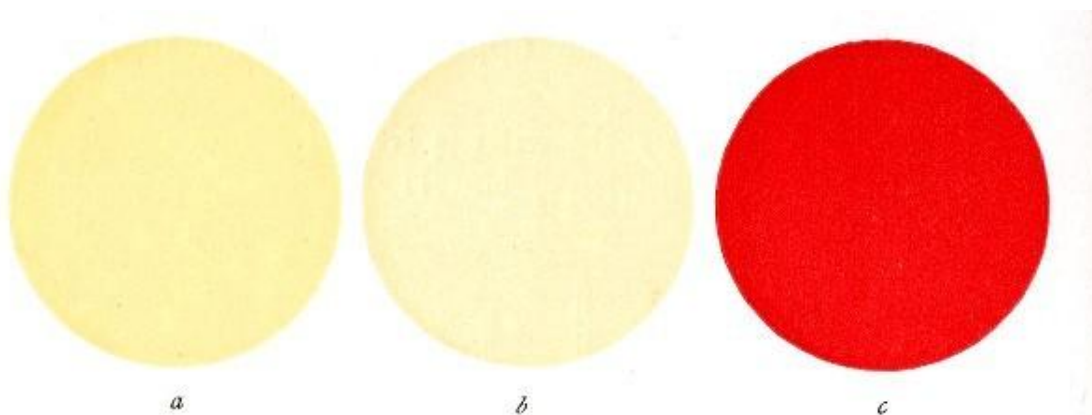


Рис. 98.—а,

Образец отфильтрованного мясного экстракта или питательного желатина, к которому был добавлен фенолфталеин. Среда является кислой, о чем свидетельствует неизменный цвет образца. b, то же самое нейтрализовано добавлением $n/10$ NaOH. Образование этого бледно-розового цвета указывает на то, что достигнута "конечная точка", или нейтральная точка по отношению к фенолфталеину. Если такой образец охладить, скажем, до 30° или 20° C, будет обнаружено, что цвет становится более отчетливым и определенно более глубоким и ярким, похожим на тот, что показан в c. c. Также, если после достижения конечной точки к образцу добавить еще $0,5^{\circ}$ c или $1,0^{\circ}$ c $n/10$ NaOH, о выраженной щелочности свидетельствует показанный здесь глубокий цвет.

(В) выполните "контрольное" титрование (иногда может потребоваться два контроля) следующим образом:

1. Отмерьте 25 г мясного экстракта в один из стаканов, промойте отмеренное количество кипящей водой и добавьте фенолфталеин, как в первом расчете.

2. Добавьте из пипетки $n/1$ NaOH, чуть меньше, чем эквивалентно количеству децибелового содового раствора, необходимого для нейтрализации 25° c среды. (Например, если в первой оценке требовалось 5° c $n/10$ NaOH, чтобы сделать 25° c среды нейтральными по отношению к фенолфталеину, добавьте только $0,48^{\circ}$ c $n/1$ NaOH.) Погрузите стакан на водяную баню.

3. Завершите титрование с помощью $n/10$ NaOH.

4. Запишите количество $n/10$ раствора NaOH, необходимое для завершения титрования, и добавьте его к эквиваленту $n/1$ раствора NaOH, введенного ранее. Примите итоговую сумму за правильную оценку.

Способ выражения реакции.—

Реакцию или *титр* мясного экстракта, среды или любого раствора, оцененного вышеописанным способом, удобнее всего выразить указанием количества кубических сантиметров обычной щелочи (или обычной кислоты), которое потребовалось бы для придания *одному литру* раствора абсолютной нейтральности по отношению к фенолфталеину.

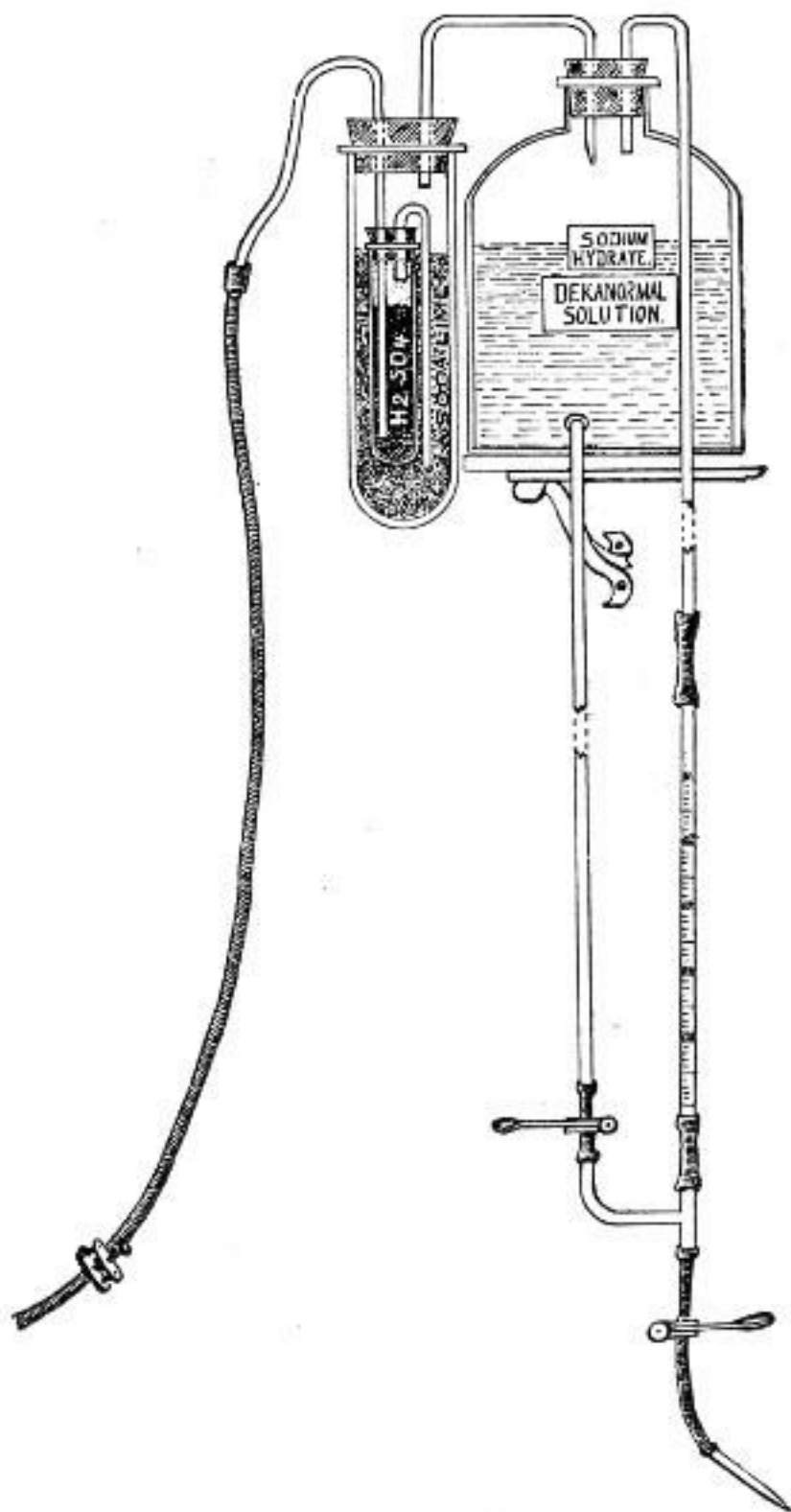


Рис. 99.—Запасная бутылка

для деканормального содового раствора.

Знак + (плюс) ставится перед этим числом, если исходный раствор реагирует с кислотой, и знак - (минус), если он реагирует со щелочью.

Например, "мясной экстракт + 10" указывает на образец мясного экстракта, который вступает в кислотную реакцию с фенолфталеином, и для его нейтрализации потребуется добавить 10 % *обычного* NaOH на литр.

Примечание.—Такой раствор, вероятно, будет реагировать щелочью на лакмусовую бумажку.

И наоборот, если в результате наших экспериментов по титрованию мы обнаружим, что для нейтрализации 25 г мясного экстракта требуется добавление 5 г *n*/10 NaOH, то для 1000 г мясного экстракта потребуется добавление 200 г *n*/10 NaOH = 20 г *n*/1 NaOH.

И эта последняя цифра, 20, перед которой стоит знак + (*т. е.* +20), означающий, что это кислота, указывает на реакцию мясного экстракта.

Примечание.—Стандартные растворы соды следует готовить путем точных измерений, контролируемых титрованием, из исходного раствора 10N NaOH, который должен быть очень тщательно стандартизирован. Если сделан большой запас или расход невелик, этот исходный раствор следует хранить в баллоне-аспираторе, доступ к которому воздух может получить только после того, как он будет высушен и освобожден от CO₂. Это можно сделать, предварительно пропустив его через H₂SO₄ с добавлением натриевой извести или только натриевой извести с помощью устройства, подобного тому, которое показано на рисунке 99, где также показано постоянное расположение бюретки для подачи небольших отмеренных количеств деканонизированного содового раствора.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ СРЕДСТВ МАССОВОЙ ИНФОРМАЦИИ.

Различия в реакции среды, в которой она выращивается, вызовут не только различия в скорости роста любой данной бактерии, но также и хорошо заметные различия в ее культурных и морфологических признаках; и будет обнаружено, что почти каждый организм влияет на определенную "оптимальную реакцию" - точку, которую необходимо тщательно определить для каждого. Однако для большинства бактерий "оптимум" обычно довольно близко приближается к + 10; и поскольку эксперимент показал, что эта реакция наиболее полезна для рутинной лабораторной работы, именно она может быть принята в качестве стандарта для всех питательных сред, полученных из мясного экстракта.

Вкратце, метод нормирования литра среды до +10 заключается в вычитании 10 из исходного *титра* массы среды; остаток указывает количество кубических сантиметров обычного раствора соды, которое необходимо добавить в среду на литр, чтобы реакция достигла +10.

Стандартизированный питательный бульон.—Например, готовится бульон на 1000 гр.; при первом титровании обнаруживается

Для нейтрализации при температуре 1,25°с требуется добавление 5,50°с *n*/10 NaOH.

Два элемента управления дают следующие результаты:

для нейтрализации 2,25°с требуется добавление 5,70°с *n*/10 NaOH.

Для нейтрализации при температуре 3,25°с требуется добавление 5,60°с *n*/10 NaOH.

При усреднении этих двух контрольных значений для нейтрализации при 25°С требуется добавление 5,65 °С н/ 10 NaOH, и, следовательно, при 1000°С требуется добавление 226 °С н/10 NaOH, или 22,60 °С н/ 1 NaOH, или 2,26 °С н/ 10 NaOH.

Начальный *титр* бульона = +22,6, и поэтому требуется добавление (22,6 - 10 °С) = 12,6 °С н/ 1 NaOH на литр, чтобы реакция завершилась +10.

Но три титрования, каждое на 25°С среды, уменьшили исходную массу бульона до (1000-75 °С) = 925 °С. Количество н / 1 NaOH, необходимое для проведения реакции при этом количестве среды + 10, можно определить следующим образом:

1000 у.е.: 925 у.е.:12,6 у.е.:х.

Тогда х = 11,65 у.е. н/1 NaOH.

Однако, по возможности, требуемую реакцию производят добавлением деканонизированного раствора соды из-за незначительного увеличения, которое он вызывает в объеме, и, как следствие, незначительного нарушения процентного состава среды. С помощью пипетки, отмеренной до 0,01 °С. Можно подавать очень небольшие количества; но если рассчитанное количество исчисляется тысячными долями кубического сантиметра, их заменяют соответствующими количествами обычной или даже децинормальной соды.

В приведенном выше примере необходимо добавить 11,65 с.с. нормального NaOH или его эквивалент, 1,165 с.с. деканормального NaOH. Поскольку первое количество слишком велико, а второе неудобно мало для точного измерения, общий вес соды получается путем замены 1,16 гр. деканормального содового раствора либо 0,05 гр. обычного содового раствора, либо 0,5 гр. децинормального содового раствора.

Стандартизация питательного агара и желатина.—Метод стандартизации агара и желатина в точности аналогичен методу, описанному в разделе "Бульон".

ФИЛЬТРАЦИЯ СРЕД.

Текущие среды обычно фильтруют через прочную шведскую фильтровальную бумагу (иногда через фарфоровую фильтровальную свечу), и для ускорения скорости фильтрации фильтровальную бумагу следует складывать в форму, известную как "физиологический фильтр", а не в обычную форму "квадранта", поскольку таким образом получается большая поверхность для фильтрации и меньшая площадь контакта со стеклянной воронкой, поддерживающей ее.

Чтобы сложить фильтр, выполните следующие действия:

1. Возьмите круглый лист фильтровальной бумаги и согните его точно по центру, чтобы получился полукруг (рис. 100, а).
2. Сложите полукруг ровно пополам, чтобы получился квадрант; сделайте складку 2, отчетливо проведя по ней большим пальцем, затем снова разверните фильтр в полукруг.
3. Сложите каждый конец полукруга к центру и таким образом сформируйте еще один квадрант; разгладьте две новые складки 3 и 3а, образованные таким образом, и снова раскройте в полукруг.

4. Теперь полукруг выглядит так, как показано на рисунке 100, а, темные линии указывают на уже сформированные складки.

5. Сложите точку 1 к точке 3, а от 1а к 3а, чтобы образовались складки 4 и 4а, обозначенные на схеме светлыми линиями. Сложите точку 1 до 3а, а точку 1а до 3, чтобы сформировать складки 5 и 5а.

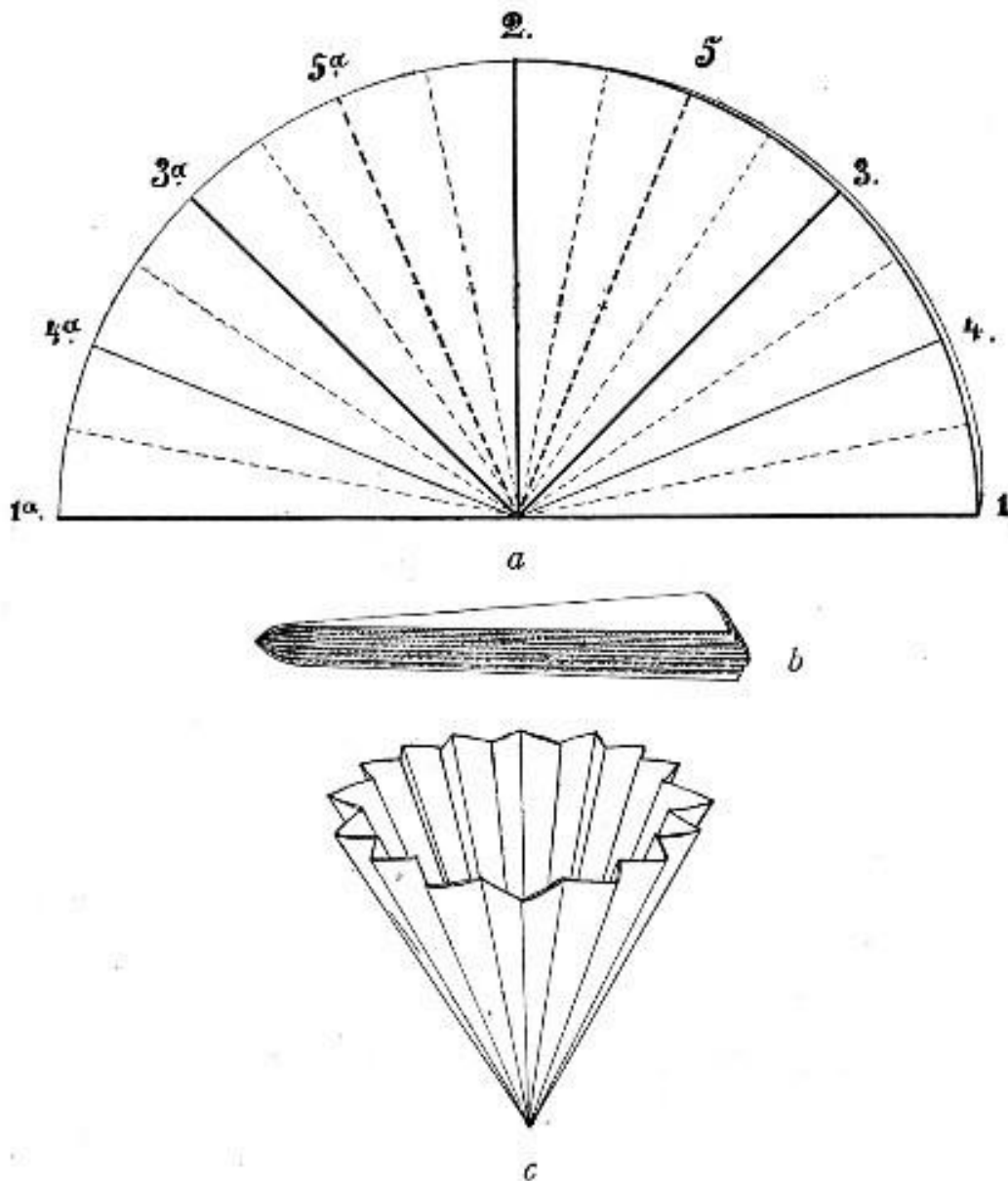


Рис.

100. Складывание фильтра: а, фильтр сложен пополам, видны складки; б, внешний вид фильтра по завершении складывания; в, фильтр раскрыт и готов к использованию.

6. До сих пор все складки были сделаны на одной стороне бумаги. Теперь разделите каждый из восьми секторов складкой, проходящей через его центр на противоположной стороне листа, обозначенной слабыми прерывистыми линиями на схеме. Постепенно сгибайте фильтр по мере выполнения каждой складки, и по завершении фильтр примет форму клина, как показано на рисунке 100, б.

При раскрытии фильтр принимает форму, представленную на рисунке 100, с.

Затем сложенный фильтр помещают в стеклянную воронку, установленную на подставке для реторт, и перед началом фильтрации среды смачивают горячей дистиллированной водой.

Разжижаемые твердые среды фильтруются через специально изготовленную фильтровальную бумагу "папье Шарден", которая продается в коробках с двадцатью пятью готовыми сложенными фильтрами.

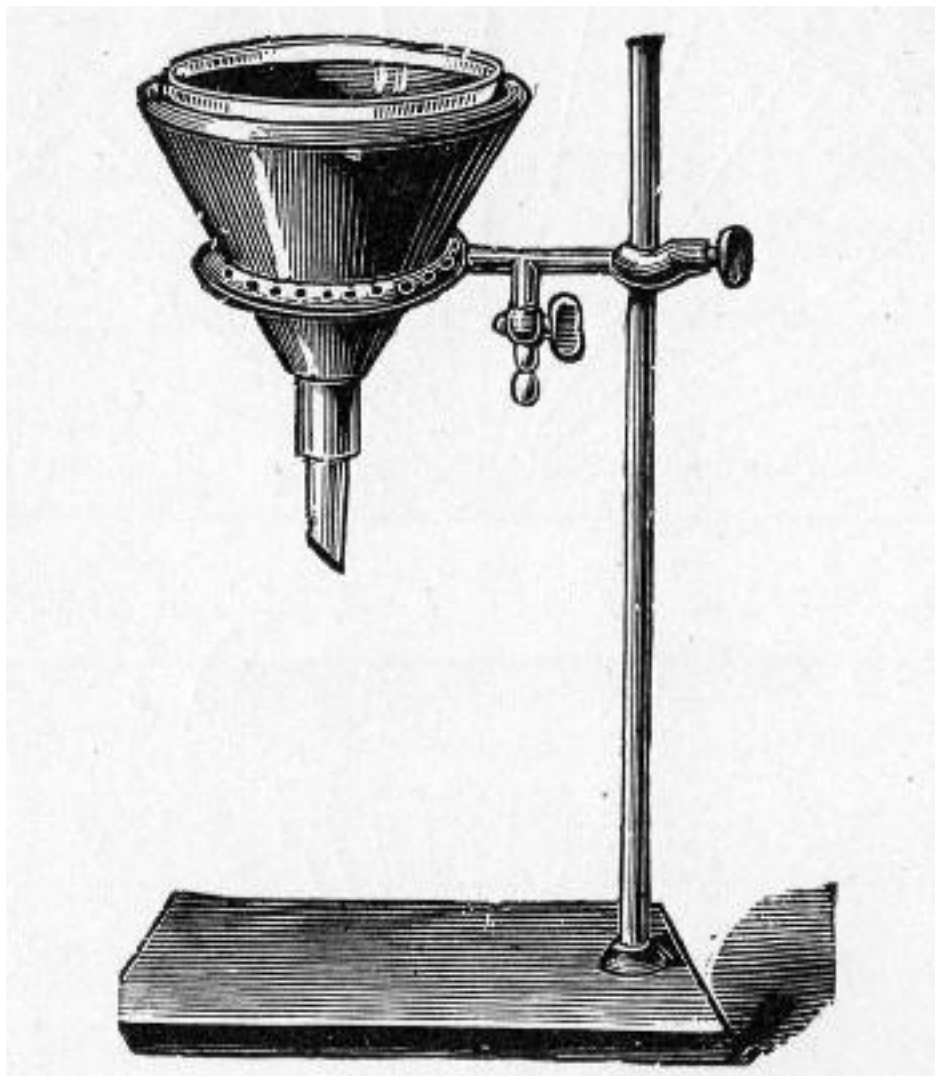


Рис. 101. Воронка фильтра для

горячей воды и кольцевая горелка.

Желатин, приготовленный надлежащим образом, фильтруется через эту бумагу так же быстро, как бульон через шведскую фильтровальную бумагу, и не требует использования воронки для подачи горячей воды.

Аналогичным образом, агар, при правильном приготовлении, легко фильтруется, хотя и не так быстро, как желатин. При сильном "перемешивании", а также в зимние месяцы, необходимо окружить стеклянную воронку, в которой происходит фильтрация агара, рубашкой с горячей водой. Это делается путем помещения стеклянной воронки внутрь медной воронки с двойными стенками - пространство между стенками заполняется водой при температуре около 90°C - и

установки последней на кольцевую газовую горелку, прикрепленную к подставке для реторт (рис. 101). Газ поджигается, а водяная рубашка поддерживается при высокой температуре до завершения фильтрации. Если лабораторный паровой стерилизатор достаточно велик, иногда удобнее поместить колбу и фильтровальную воронку внутрь, закрыть стерилизатор и дать возможность фильтрации протекать в атмосфере горячего пара, чем использовать газовую конфорку и воронку для подачи горячей воды.

ХРАНЕНИЕ НОСИТЕЛЕЙ ОПТОМ.

После фильтрации разлейте среду по стерильным литровым колбам с ватными пробками и стерилизуйте в пароварке по двадцать минут каждый из трех дней подряд. После третьей стерилизации, когда колбы и содержимое остынут, срежьте верхнюю часть ватной пробки так, чтобы она прилегала к горлышку колбы; вдавите пробку на небольшое расстояние в горлышко колбы и залейте растопленным парафином до уровня горлышка. Когда воск застынет, колбы хранят в прохладном темном шкафу для дальнейшего использования.

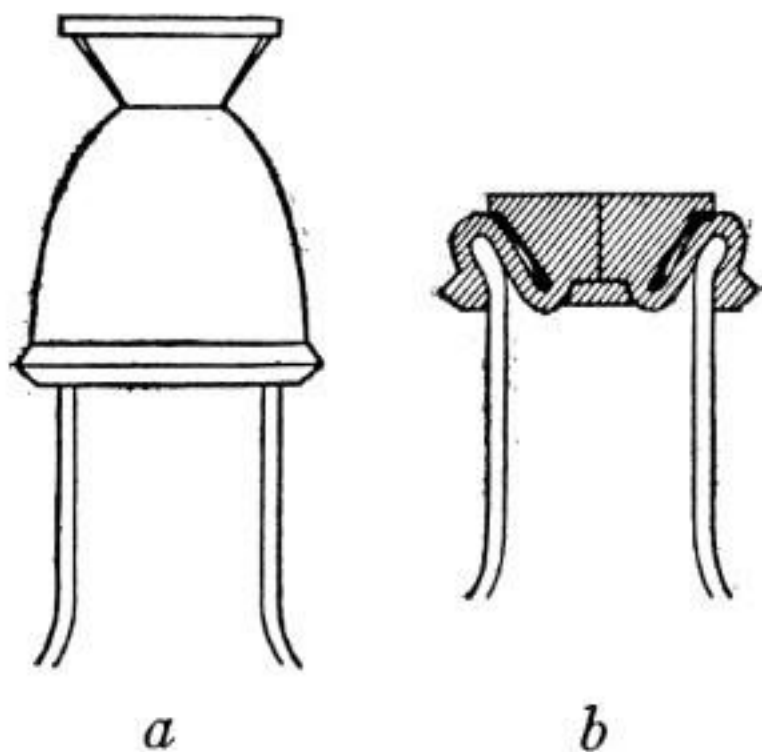


Рис. 102.—Резиновая крышка, закрывающая хранящуюся бутылку. а - до и б - после стерилизации.

Этот план не является абсолютно удовлетворительным, хотя иногда используется очень часто, и предпочтительнее разливать жидкость в бутылки из кремневого стекла с длинным горлышком (размером в кварту, выдерживающие около 1000 °с, например, те, в которых продается пастеризованное молоко) и закрывать горлышко бутылки специальной резиновой пробкой.^[3] Этот колпачок изготовлен из мягкой резины, нижняя часть куполообразной формы с тонкими стенками надевается на горлышко бутылки (рис. 102, а). Верхняя часть сплошная, но с четким острым срезом (сделанным катарактным или тентомическим ножом), проходящим полностью по его оси от центра диска до вершины купола. Во время стерилизации воздух из горлышка бутылки, расширяющийся под действием тепла, вытесняется через клапанное отверстие в

твердой части пробки. При извлечении бутылки из паровой камеры жидкость сжимается по мере охлаждения, и давление наружного воздуха вдавливают твердый кусок резины в горлышко бутылки и прижимает края щели друг к другу (рис. 102, б). Запечатанный таким образом флакон сохранит свое содержимое стерильным в течение неопределенного периода времени без потерь в результате испарения.

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ТРУБОК.

После окончательной фильтрации питательную среду обычно "забирают в тубу" — т. е. разливают в стерильные пробирки в определенных отмеренных количествах, обычно 10 °с. Иногда этот процесс осуществляется с помощью большой разделительной воронки, оснащенной "трехсторонним" краном, который сообщается с маленькой градуированной пробиркой (емкостью 20 °с и градуировкой в кубических сантиметрах), прикрепленной сбоку. Форма этого устройства, известного как воронка Трескова, делает его особенно подверженным повреждениям. Поэтому лучше установить менее дорогое устройство, которое будет одинаково хорошо служить этой цели (рис. 103).

У трехходового запорного крана Geissler трубка с одной стороны крана заточена наклонно на своем конце, а трубка с противоположной стороны отрезана в пределах 3 см от крана. Короткая трубка соединяется с помощью перфорированной резиновой пробки с прочной стеклянной трубкой длиной 10 см (отверстие 1,5 см). Третий канал трехходового крана соединен с помощью резиновой трубки с соплом обычной разделительной воронки. Наконец, приемный цилиндр над трехходовым краном градуируют в кубических сантиметрах до 20, наливая в него отмеренное количество воды и отмечая различные уровни снаружи ромбиком для письма.

Жидкую среду, содержащую углеводы, заливают в пробирки для брожения (см. рис. 21); или в обычные пробирки для брожения, внутри которых уже есть перевернутые пробирки меньшего размера (рис. 104) для сбора продуктов роста газообразующих бактерий. При первом заполнении маленькие пробирки плавают на поверхности среды, после первой стерилизации среда заменяет почти весь воздух, а после окончательной стерилизации газовые пробирки погружаются в воду и полностью заполняются средой.

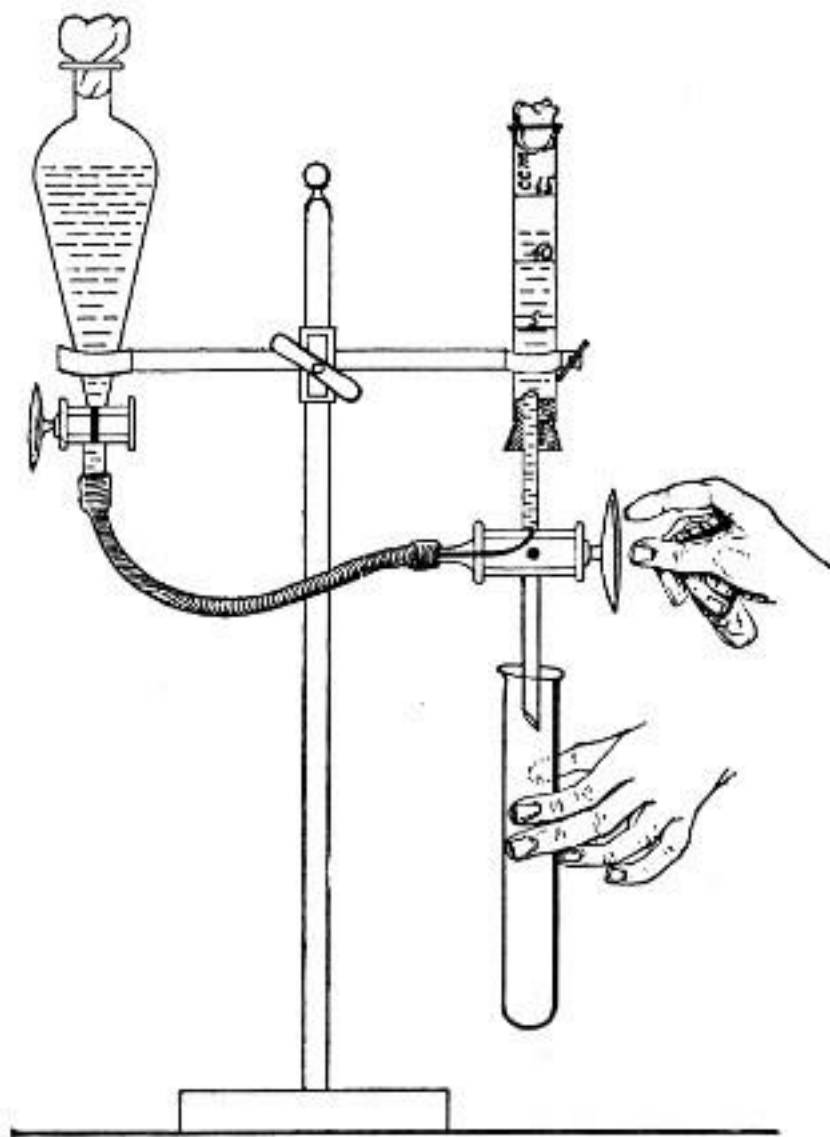


Рис. 103.—Разделительная воронка и трехходовой отвод для подачи насосно-компрессорной среды.



Рис. 104.—Газовая трубка (Дарем).

Хранение носителей в "тубах".—Носители после упаковки в тубу лучше всего хранить в вертикальной упаковке в продолговатых коробках с внутренним размером 37 см в длину, 12 см в ширину и 10 см в глубину. Каждый ящик (рис. 105) имеет подвижную перегородку, образованную вертикальной поверхностью утяжеленного треугольного деревянного бруска, свободно скользящего по дну (рис. 105, А); или плоским куском дерева, скользящим в металлическом пазу на дне ящика, который можно зафиксировать в любом месте, затянув винт с накатанной головкой на латунном направляющем стержне, который проходит через перегородку (рис. 105, Б). Передняя часть коробки снабжена ручкой и целлулоидной этикеткой с названием содержащегося носителя. Эти коробки размещаются на полках в темном шкафу — или, предпочтительно, в железном сейфе, — который должен быть максимально герметичным, а на дверцах должна быть нанесена надпись "media stores".

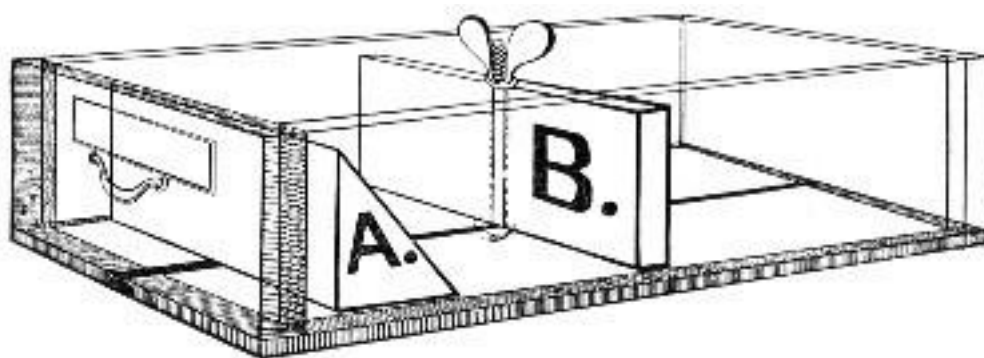


Рис. 105.Средний

блок, показывающий альтернативные разделы А и В.

СНОСКИ:

[3] Этот резиновый колпачок был изготовлен для меня компанией Holborn Surgical Instrument Co., Thavies Inn, Лондон, WC

XI. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.

ОБЫЧНЫЕ ИЛИ БИРЖЕВЫЕ НОСИТЕЛИ.

Питательный бульон.—

1. Отмерьте мясной экстракт двойной крепости при температуре 500°С в литровую колбу и добавьте дистиллированную воду при температуре 300°С.
2. Взвесьте 10 граммов пептона Витте (= 1%), 5 граммов соли (= 0,5%) и смешайте в однородную пасту с 200 граммами дистиллированной воды, предварительно нагретой до 60 ° С. (Следите за тем, чтобы не осталось нераскрывшихся шариков пептона.)
3. Добавьте пептоновую эмульсию к мясному экстракту в колбе и нагревайте в пароварке в течение сорока пяти минут (для полного растворения пептона и стабилизации кислотности мясного экстракта).
4. Оцените реакцию среды; проконтролируйте результат; визуализируйте реакцию готовой среды +10 (видео, стр. 155).
5. Нагревайте в течение получаса в пароварке при температуре 100°С. (для полного осаждения фосфатов и т.д.).
6. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу в стерильную колбу.
7. Разлейте по стерильным пробиркам (по 10 мл в каждую пробирку).
8. Стерилизуйте в пароварке по двадцать минут каждый из трех дней подряд, т.е. прерывистым методом (смотрите стр. 35).

Примечание.—В качестве альтернативного метода, когда нет ни свежего, ни замороженного мяса, питательный бульон можно приготовить из коммерческого мясного экстракта следующим образом:

Бульон "Лемко".—

1. Отмерьте 250°С дистиллированной воды в литровую колбу.
2. Взвесьте 10 граммов мясного экстракта Liebig's Lemco на листе чистой фильтровальной бумаги и добавьте в воду в колбе. Хорошо встряхните колбу, чтобы получилась однородная эмульсия мясного экстракта.
3. Взвесьте пептон Витте (10 граммов), соль (5 граммов). Смешайте в однородную массу 100%-ную дистиллированную воду, предварительно нагретую до 60 °С.
4. Добавьте эмульсию пептонной соли к эмульсии мясного экстракта в колбе и добавьте дистиллированную воду при температуре 650 °С. Прогревайте в пароварке в течение сорока пяти минут.
5. Приготовьте стандартную среду и готовьте так же, как для питательного бульона.

Питательный желатин.—

1. Взвесьте 2-литровую флягу на походных весах (рис. 106) и обратите внимание на вес или внимательно установите противовес.

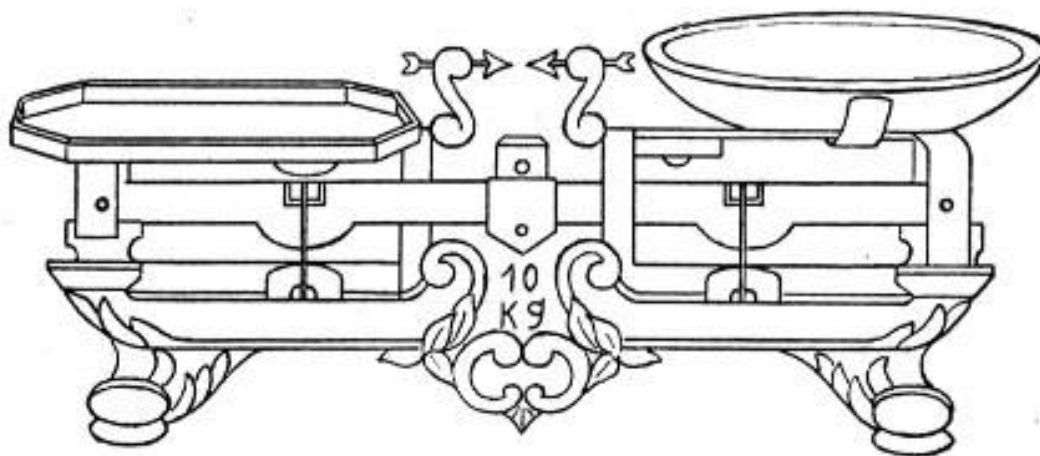


Рис. 106. Баланс

поездки.

Чрезвычайно полезным противовесом является небольшой цилиндр из листовой латуни диаметром около 38 мм. высотой 38 мм в диаметре, с воронкообразным верхом и снабжен боковой трубкой, с помощью которой можно вытряхивать содержимое - мелкую "пыль" (рис. 107).



Рис. 107. Противовес; вес в пустом состоянии —

35 грамм; в заполненном пылью - 200 грамм.

2. Отмерьте мясной экстракт двойной крепости при температуре 500 °с в "тарированную" колбу.

3. Взвесьте и смешайте 10 граммов пептона, 5 граммов соли и доведите до состояния густой пасты с 150 г дистиллированной воды; затем добавьте эмульсию к мясному экстракту в колбе; также добавьте 100 граммов листового желатина, нарезанного небольшими кусочками; поставьте колбу на водяную баню и доведите до кипения.

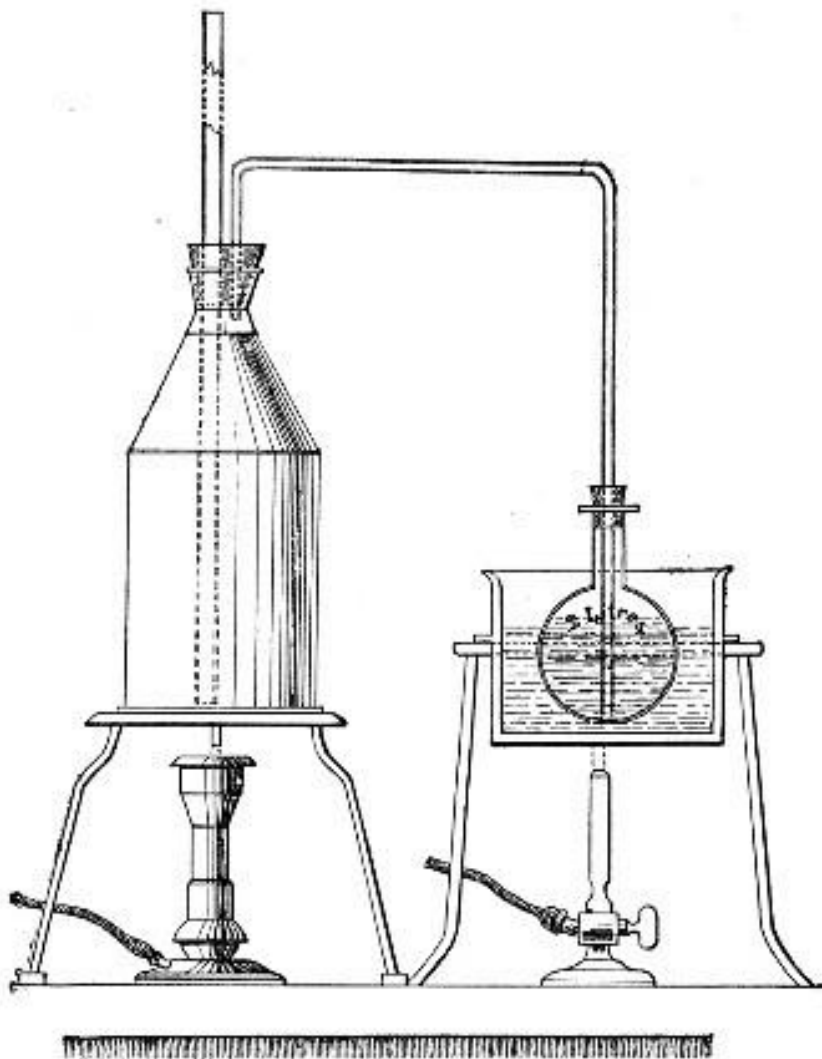


Рис.

108. Расположение парового бака и водяной бани для приготовления среды.

4. Поставьте 5-литровую жестяную банку (с медным дном, такую, какая используется для приготовления дистиллированной воды) сбоку от водяной бани, наполните банку кипятком и поместите под нее зажженную горелку Бунзена. Прикрепите к горлышку банки длинную предохранительную трубку, а также нагнетательную трубку, согнутую вдвое под прямым углом; отрегулируйте трубку так, чтобы она доставала до дна внутренней части колбы с желатином, и т.д. (Рис. 108).

5. Поддерживайте воду в паровой бане при сильном кипении и готовьте на пару при температуре 100°C , выпаривая среднюю массу в течение десяти минут, за это время желатин полностью растворится. Во время этого процесса определенное количество пара конденсируется в виде воды в колбе средней емкости — отсюда необходимость использования

мясного экстракта двойной крепости, — но при постоянном кипении на водяной бане этот уровень конденсации не превысит 100 °С.

6. Взвесьте флягу и ее содержимое; затем (1115[4] граммы + вес фляги) минус (вес фляги и ее содержимого) равняется весу воды, необходимому для получения объема в 1 литр. Добавление необходимого количества воды осуществляется следующим образом:

В одну чашу весовых весов поместите противовес из тарированной колбы (или ее эквивалент по весу) вместе с грузами, составляющими *расчетный средний вес*. В противоположную кастрюлю поставьте колбу со средней массой. Теперь добавьте кипящую дистиллированную воду из бутылки для мытья посуды, пока обе кастрюли не будут точно сбалансированы.

7. Титруйте и оценивайте реакцию массы среды; контролируйте результат. Рассчитайте количество раствора соды, необходимое для проведения реакции средней массы +10 (*т.е.* рассчитайте для 1000°с, за вычетом количества, используемого для титрования).

8. Добавьте необходимое количество содового раствора и нагревайте в пароварке при температуре 100°С. в течение двадцати минут, чтобы осаждались фосфаты и т.д.

9. Дайте средней массе остыть до 60 ° С. Хорошо взбейте белки двух яиц, добавьте к содержимому термоса и поставьте в пароварку при температуре 100 ° С. примерно на полчаса (пока яичный белок не свернется и не образуются большие твердые массы, плавающие на прозрачном желатине).

10. Процедите через папье-шарден в стерильную колбу.

11. Тюбик в количестве 10 гр.

12. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100°С в течение двадцати минут каждый из трех дней подряд —*т.е.* прерывистым методом.

Питательный Агар-агар.—

1. Взвесьте 2-литровую флягу и точно отметьте вес — или уравновесьте.

2. Отмерьте мясной экстракт двойной крепости при температуре 500 °с в "тарированную" колбу.

3. Взвесьте и смешайте 10 граммов пептона, 5 граммов соли и 20 граммов порошкообразного агара, доведите до состояния густой пасты с 150°с дистиллированной воды и добавьте к мясному экстракту в колбе; поставьте колбу на водяную баню.

4. Подготовьте пароварку и водяную баню, как уже указано (для приготовления желатина) и показано на рисунке.

5. Пропускайте горячий пар (при 100 ° С) через среднюю массу в течение двадцати пяти минут, за это время происходит полное растворение агара.

6. Теперь взвесьте колбу и ее содержимое; затем (1035[5] граммы + вес колбы) минус (вес колбы и ее содержимого) равняется весу воды, необходимой для приготовления основной массы среды в 1 литре. Добавьте необходимое количество (см. Приготовление желатина, стр. 166, шаг 6).

7. Титруйте и оценивайте реакцию массы среды; контролируйте результат. Рассчитайте количество раствора соды, необходимое для проведения реакции средней массы + 10 (т.е., рассчитанное на 1000°с, за вычетом количества, используемого для титрования).
8. Добавьте необходимое количество содового раствора и поставьте в пароварку на двадцать минут (для полного осаждения фосфатов и т.д.).
9. Дайте массе среднего размера остыть до 60 ° С. Хорошо взбейте белки двух яиц, добавьте к содержимому колбы и поставьте в пароварку при температуре 100 ° С. примерно на *один час* (пока яичный белок не свернется и не образуются большие твердые массы, плавающие на прозрачном агаре.)
10. Процедите через папье-шарден, при необходимости с помощью воронки для горячей воды (рис. 101), в стерильную колбу.
11. Пробирка в количестве 10 или 15 гр.
12. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100°С в течение тридцати минут каждый из трех дней подряд —*т.е. прерывистым методом.*

Сыворотка крови (уплотненная).-

1. Стерилизуйте стеклянную банку цилиндрической формы (рис. 109) и ее крышку сухим нагревом или промывкой сначала эфиром, а затем спиртом и высушиванием.
2. Соберите кровь быка или овцы на бойне в стерильный баллон.
3. Дайте сосуду постоять пятнадцать минут, чтобы кровь свернулась. (Это необходимо сделать перед тем, как покинуть бойню, иначе сыворотка будет окрашена гемоглобином.)
4. Отделите сгусток крови от стенок сосуда с помощью стерильной стеклянной палочки (если этого не делать, выход сыворотки будет намного меньше) и поместите цилиндр в морозильную камеру на двадцать четыре часа.
5. Извлеките сыворотку стерильными пипетками или перелейте сифоном и разлейте по стерильным пробиркам (по 5 стаканов в каждой) или флаконам.
6. Нагревайте пробирки с сывороткой до 56 ° С на водяной бане в течение получаса каждый из двух последующих дней.
7. На третий день нагрейте пробирки в наклонном положении в компрессоре для получения сыворотки примерно до 72°С. (При этой температуре образуется довольно прозрачный коагулум; выше 72°С образуется густой мутный коагулум.)

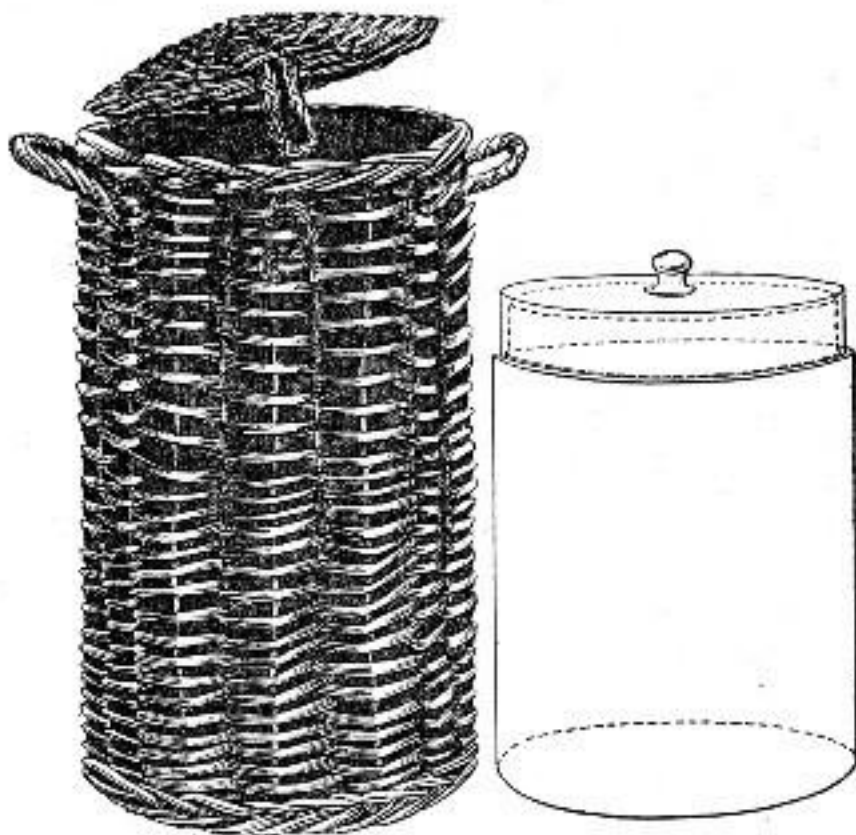


Рис. 109. Банка для сыворотки

крови с плетеной корзинкой для транспортировки.

Распылитель сыворотки (рис. 110) в своей простейшей форме представляет собой прямоугольную медную коробку с двойными стенками, закрытую неплотной стеклянной крышкой и обтянутую войлоком или асбестом — пространство между стенками заполнено водой. Инспиратор установлен на регулируемых ножках, так что сыворотка может затвердевать под любым желаемым "наклоном", и нагревается снизу горелкой Бунзена, управляемой терморегулятором. Более сложные формы напоминают по форме духовку с горячим воздухом (рис. 26) и снабжены регулируемыми полками, позволяющими добиться любого желаемого наклона формы для приготовления сыворотки.

8. Поместите пробирки в инкубатор при температуре 37°C на сорок восемь часов, чтобы удалить те из них, которые были загрязнены. Храните оставшееся в прохладном месте для дальнейшего использования.

Альтернативный метод.

Шаги 1-5, как указано выше.

6. Стерилизуйте сыворотку дробным методом, то есть выдерживая на водяной бане при температуре 56°C в течение полчаса каждый из шести дней подряд; храните в жидком состоянии.

7. При необходимости коагулируйте в компрессоре.

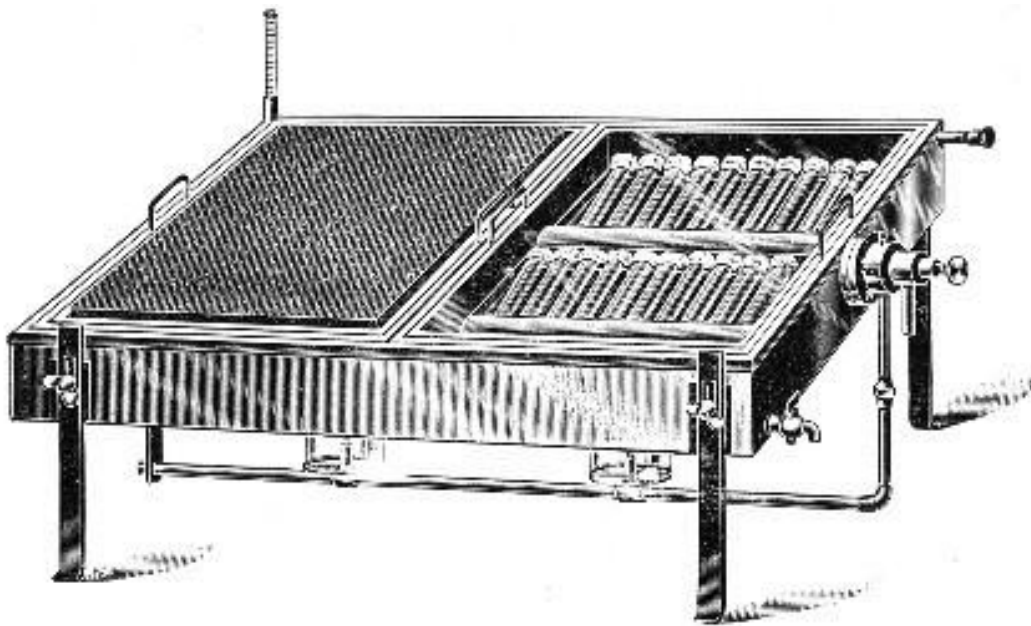


Рис. 110.—

Распылитель сыворотки.

Вода для сыворотки.—

Это составляет основу многих полезных сред и готовится следующим образом:

1. Соберите кровь на бойне (см. стр. 168) и, когда она хорошо свернется, соберите всю сгущенную сыворотку и отмерьте в градуированный цилиндр.
2. На каждые 100 мл сыворотки добавьте 300 мл дистиллированной воды и перемешайте в колбе.
3. Нагревайте смесь в пароварке при температуре 100°C в течение тридцати минут. (Это разрушает любую диастатическую закваску, присутствующую в сыворотке, и частично стерилизует жидкость.)
4. При помутнении процедите.
5. Если нет необходимости сразу завершить стерилизацию сыворотки двумя последующими обработками паром при температуре 100°C в течение двадцати минут с интервалом в двадцать четыре часа.

Цитратный кровяной агар. Guy's.—

1. Убейте маленького кролика парами хлороформа и прибейте его гвоздями к доске (как для вскрытия); тщательно смочите шерсть 2%-ным раствором. раствор лизола.
2. Стерилизуйте несколько пар щипцов, ножниц и т.д. кипячением.
3. Отрастите кожу на грудной клетке стерильными инструментами.
4. Вскройте грудную полость с помощью нового набора стерильных инструментов.

5. Вскройте перикард другим набором стерильных инструментов.
6. Прижгите поверхность левого желудочка раскаленным железом.
7. Возьмите стерильную капиллярную пипетку (рис. 13, с); отломите запаянный кончик стерильными щипцами.
8. Зафиксируйте сердце пинцетом и протолкните кончик пипетки через стенку желудочка и через обожженную область, отсосите закупоренный конец пипетки и заполните его кровью.
9. Перелейте все количество крови, взятой из сердца кролика, в небольшую колбу Эрленмейера, содержащую несколько стерильных стеклянных шариков и 5% концентрированной соды. раствор цитрата. (См. стр. 378.)
10. Тщательно перемешайте и отставьте в сторону на пару часов.
11. Растопите несколько тюбиков с питательным агаром (см. стр. 167) и охладите до 42 °С.
12. Стерильной 10-градусной пипеткой перелейте 1 ст.л. цитратированной крови из колбы Эрленмейера в каждую пробирку со сжиженным агаром. Вращайте пробирку между ладонями, чтобы цитратная кровь равномерно распределилась по агару.
13. Установите пробирки под наклоном и дайте среде застыть.
14. Поместите пробирки с кровяным агаром на сорок восемь часов в инкубатор при температуре 37 ° С. По истечении этого времени удалите все загрязненные пробирки.
15. Храните такие пробирки так, чтобы они оставались стерильными для дальнейшего использования.

Молоко.—

1. Налейте 1 литр свежего коровьего или козьего молока в большую разделительную воронку и нагревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение одного часа.
2. Достаньте из пароварки и оцените реакцию молока (у нормальных коров в среднем +17). При кислотности выше +20 или ниже +10 откажитесь от этого образца молока и попробуйте другое молоко из другого источника.

Откажитесь от молока, в которое в качестве консервантов были добавлены антисептики.

3. Дайте молоку остыть, когда жир или сливки поднимутся на поверхность и образуют толстый слой.
4. Отлейте обезжиренное молоко в стерильные пробирки (по 10 мл в каждую).
5. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С в течение двадцати минут каждый из пяти последующих дней.
6. Выдержите при температуре 37 ° С в течение сорока восьми часов и удалите все загрязненные пробирки. Оставшееся храните для использования в будущем.

Лакмусовая бумажка.—

1. Приготовьте молоко, как описано выше, в разделах 1-3.
2. Перелейте обезжиренное молоко в колбу.
3. Добавьте стерильный раствор лакмусовой бумажки, достаточный для окрашивания молока в темно-лавандовый цвет.
4. Пробовать, стерилизовать и т.д., как для молока.

Нутрозный агар (Эйр).—

(Это модификация хорошо известной среды Дригальского-Конради, первоначально введенной для выделения *B. typhosus*).

1. Соберите 250 г идеально свежей бычьей сыворотки (*смотрите* Сыворотку крови, стр. 168, шаги 1-5) и добавьте к ней 450 г стерильной дистиллированной воды.
2. Взвесьте 20 граммов порошка агара и разведите его в 250 мл холодной сывороточной воды.
3. Взвесьте

Пептон Витте	10 грамм
хлорида натрия	5 грамм
нутрозы	10 грамм

и растворите сыворотку в 200 мл воды, нагретой до 80°C.

4. Смешайте эмульсию агара и раствор пептона-нутрозы в тарированной колбе емкостью 2 литра и добавьте еще 100 мл сывороточной воды.
5. Завершите растворение различных ингредиентов, пропуская через колбу горячий пар, как при приготовлении питательного агара.
6. Добавьте еще 250 гр. воды для сыворотки.
7. Взвесьте колбу и ее содержимое: затем (1045 грамм + вес колбы) минус (вес колбы и ее текущего содержимого) = вес жидкости, необходимый для получения основной массы среды, равный 1 литру. Добавьте необходимое количество стерильной дистиллированной воды.
8. Титруйте и оцените реакцию средней массы. Затем стандартизируйте до реакции +2,5.
9. Разбавьте яйцом и отфильтруйте, как для питательного агара. (При осветлении после добавления яичного белка смесь должна находиться в пароварке в течение полных двух часов.)
10. После завершения фильтрации отмерьте фильтрат и на каждые 150°с среды добавляйте:

Лакмусовый раствор (Кальбаум)	20 гр.
Водный раствор кристаллического фиолетового (1:1000) (B. Hoechst)	1,5 гр.
Лактозы	1,5 гр.
11. Тюбик в количестве 15 гр.

12. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100°C по тридцать минут каждый из трех последующих дней —*т. е.* прерывистым методом в течение трех дней.

Яйцо среднее (Дорсет).—

1. Приготовьте 0,85-процентный раствор хлорида натрия при температуре 100°C. в прочной 2-литровой колбе.

2. Стерилизуйте в автоклаве при температуре 120° C в течение двадцати минут. Охладите до 20°C.

3. Возьмите 12 свежих яиц; вымойте скорлупу сначала водой, затем неразбавленным формалином: дайте скорлупе высохнуть.

4. Разбейте яйца в стерильный градуированный цилиндр и измерьте общий объем смешанных белков и желтков. Добавьте одну часть стерильного физиологического раствора к трем частям смешанных яиц.

5. Перелейте полученную смесь в большую бутылку с широкой горловиной, предварительно простерилизованную. Добавьте стерильные стеклянные шарики и тщательно взбивайте в механическом шейкере в течение примерно тридцати минут или взбивайте венчиком для взбивания яиц.

6. Процедите сливочное масло через муслин грубого помола в стерильную колбу.

Примечание.— Несколько капель спиртового раствора основного фуксина (достаточно для придания определенного розового цвета) или несколько капель водостойких китайских чернил, добавленных в среду на этой стадии, облегчают последующее "вылавливание" колоний.

7. Тюбик в количестве 10 гр.

8. Выдерживайте в наклонном положении во вдыхателе при температуре 75° C в течение одного часа.

9. Поместите пробирки на сорок восемь часов в инкубатор при температуре 37 ° C и удалите все загрязненные пробирки.

Чтобы предотвратить высыхание, между этапами 8 и 9 в каждый тюбик можно добавить 0,5 стакана глицеринового бульона (см. стр. 209).

10. Те пробирки со средой, которые остаются стерильными, укупорьте резиновыми колпачками и храните для дальнейшего использования.

Картофель.—

1. Выберите картофель довольно крупного размера, хорошо вымойте его и очистите от кожуры жесткой щеточкой для ногтей.

2. Очистите и выньте глазки.

3. Удалите цилиндрики из каждой картофелины самого большого диаметра с помощью яблочной сердцевинки или большого пробкорезного станка (*то есть* диаметром около 1,4 см).

Реакция свежего картофеля на фенолфталеин является сильноокислой. Поэтому, если требуется, чтобы температура картофеля была приблизительно +10, как для выращивания некоторых вибрионов, цилиндры следует замочить в 1-процентном растворе. раствор карбоната натрия в течение тридцати минут.

4. Разрежьте каждый цилиндр наискось от края до края, формируя две клиновидные части.

5. Положите небольшой кусочек стерилизованной ваты, смоченный стерильной водой, на дно стерильной пробирки; вставьте дольку картофеля в пробирку так, чтобы ее основание опиралось на вату. Теперь заткните трубку ватой (рис. 111).

6. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100°C. в течение двадцати минут каждый из *пяти* дней подряд.



Рис. 111.Картофельная трубочка.

Примечание.—Пробкорез, предназначенный для нарезания картофельных цилиндров, должен быть покрыт серебристым гальваническим покрытием как внутри, так и снаружи, а нож,

используемый для разделения цилиндриков, должен быть серебряным или с посеребренным покрытием. При соблюдении этих мер предосторожности картофельные дольки сохраняют свой белый цвет и на них не будет заметно обесцвечивания, которое так часто наблюдается при использовании стальных инструментов.

Пивное сусло.—сусло в основном используется в качестве среды для выращивания дрожжей, плесневых грибов и т.д., как в жидкой форме, так и при затвердевании путем добавления желатина или агар. Сусло готовится следующим образом:

1. Взвесьте 250 граммов измельченного солода и поместите в 2-литровую колбу.
2. Добавьте 1000°с дистиллированной воды, нагретой до 70°С, и закройте колбу резиновой пробкой.
3. Поместите колбу на водяную баню с температурой 60°С. и дайте мацерации продолжаться в течение одного часа.
4. Процедите через сливочное масло в чистую колбу и нагревайте в пароварке в течение тридцати минут.
5. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу.
6. Расфасовать по 10 мл в пробирки или хранить во флаконах.
7. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100 ° С. в течение двадцати минут каждый из трех дней подряд.

Следует не вмешиваться в естественную реакцию сусла.

Примечание.—Иногда удобнее получать "без упаковки"[6] пивное сусло непосредственно с пивоварни. В этом случае его разбавляют равным количеством дистиллированной воды, настаивают на пару в течение часа, фильтруют, разливают в стерильные колбы или пробирки и стерилизуют прерывистым методом.

Желатиновое сусло.—

1. Отмерьте сусло (приготовленное, как указано выше) при температуре 900°с в стерильную колбу.
2. Взвесьте 100 граммов желатина (= 10%) и добавьте его в сусло в колбе.
3. Взбивайте смесь на пару в течение десяти минут, чтобы желатин растворился.
4. Остудить до 60°С; взбить с яйцом, как для получения питательного желатина (видео, стр. 164).
5. Процедите через пюре-шарден.
6. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Агар для сусла.—

1. Отмерьте сусло (как указано выше) при температуре 700°с в стерильную колбу.

2. Взвесьте 20 граммов порошкообразного агара; смешайте в однородную массу с 200 г холодного сусла и добавьте в сусло в колбе.
3. Пропускайте горячий пар через смесь в течение двадцати минут, чтобы агар растворился.
4. Остудить до 60° С; смешать с яйцом, как для приготовления питательного агара (видео, стр. 167).
5. Процедите через папье-шарден, используя воронку для горячей воды.
6. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Пептоновая вода (Данхэм).—

1. Взвесьте пептон Витте (10 граммов) и соль (5 граммов) и эмульгируйте примерно в 250 мл дистиллированной воды, предварительно нагретой до 60°С.
2. Перелейте эмульсию в литровую колбу и доведите до 100°С, добавив дистиллированную воду.
3. Разогревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение тридцати минут.
4. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу.
5. Тюбики в количестве по 10 г в каждой.
6. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100 ° С. в течение двадцати минут каждый из трех дней подряд.

"Сахарная" или "Углеводная" среда.—

Ранее способность бактерий вызывать гидролитические изменения углеводов веществ наблюдалась только в отношении нескольких четко определенных сахаров, но в последние годы было показано, что при использовании лакмусовой бумажки в качестве индикатора эти так называемые "реакции брожения" облегчают дифференциацию близкородственных видов, и список веществ, используемых в этой связи, был значительно расширен. Среда, приготовленные с их помощью, теперь больше не считаются специальными, а входят в состав "стандартных сред" лаборатории. Основными из этих веществ являются следующие, расположенные в соответствии с их химическим составом:

<i>Моносахариды</i>	Декстроза (глюкоза), левулоза, галактоза, манноза, арабиноза, ксилоза.
<i>Дисахариды</i>	Мальтоза, лактоза, сахарозы.
<i>Трисахариды</i>	Раффиноза (меллитоза).
<i>Полисахариды</i>	Декстрин, инулин, крахмал, гликоген, амидон.
<i>Глюкозиды</i>	Амигдалин, кониферин, салицин, гелицин, флор-ризин.
<i>Многоатомные спирты</i>	трехатомные, глицерин.

Четырехатомный, эритрит.

Пятидольный, адонит.

Шестиатомная, дульцит, (дульцит или мелампирит), изодульцит (рамноза), маннит (манниттол), сорбит (сорбитол), инозит.

Эти вещества следует получать у Кальбаума (Берлин); в чистом виде и, по возможности, в виде крупных кристаллов, а метод приготовления среды, содержащей любое из них, может быть проиллюстрирован на примере описания раствора декстрозы.

Раствор декстрозы.—

1. Взвесьте

Пептон 20 граммов

Глюкозы 10 граммов

и растереть вместе в ступке; затем эмульгировать в 100 мл дистиллированной воды, нагретой до 60°C.

2. Переложите в колбу и добавьте

Дистиллированная вода 850 °с

3. Готовьте в пароварке при температуре 100° С. в течение двадцати минут, чтобы пептон и глюкоза растворились.

4. Добавить

Лакмусовая бумажка Кубеля-Тимана (Кальбаум) 50 °с.

(Перечисленные выше вещества вступают в реакцию кислотной реакции с фенолфталеином, но по-разному в отношении нейтрального лакмусового раствора. К таким веществам, как реагирующая кислота, очень осторожно добавляйте п/ 1 раствора гидрата натрия в среду в объеме до тех пор, пока не вернется нейтральный оттенок).

5. Заполните пробирки, в которые ранее были помещены перевернутые газовые пробирки Durham.

6. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100°C. в течение *двадцати минут* каждый из трех последующих дней.

Примечание.—Ни в коем случае не следует стерилизовать эти среды в автоклаве, поскольку температуры выше 100 ° С сами по себе вызывают гидролитические изменения в рассматриваемых веществах. Не менее важно, чтобы продолжительность стерилизации не превышала двадцати минут, поскольку пренебрежение этой мерой предосторожности может привести к обесцвечиванию лакмусовой бумажки или появлению желтоватого оттенка при последующей инокуляции пробирок кислотообразующими бактериями.

Нейтральный лакмусовый раствор.

Наиболее удовлетворительным является Kubel-Tiemann, приготовленный Кальбаумом. Однако его можно приготовить в лаборатории следующим образом:

1. Взвесьте

Коммерческая лакмусовая бумажка 50 грамм,

и перелейте в хорошо закупоренную бутылку объемом 500 гр.; отмерьте 300 гр. и добавьте 95% спирта.

2. Хорошо взбалтывайте не реже одного раза в день в течение семи дней — спирт приобретет зеленый цвет.

3. Слейте зеленый спирт и долейте еще 300 мл. до 95%. Перелейте спирт в бутылку и повторите встряхивание.

4. Повторяйте этот процесс до тех пор, пока при добавлении свежего спирта жидкость не приобретет только фиолетовый оттенок.

5. Слейте спирт, оставив лакмусовую бумажку как можно более сухой. Подсоедините бутылку к воздушному насосу и выпарьте последние остатки спирта.

6. Переложите сухую лакмусовую бумажку в литровую колбу, залейте 600°с дистиллированной водой и оставьте на 24 часа при частом встряхивании.

7. Отфильтруйте раствор в чистую колбу и добавьте одну или две капли чистой концентрированной серной кислоты, пока лакмусовый раствор не приобретет отчетливый винно-красный цвет.

8. Добавьте избыток чистого твердого барина и дайте постоять, пока реакция снова не станет щелочной.

9. Фильтр.

10. Прокаливайте CO_2 через раствор до тех пор, пока реакция не станет определенно кислой.

11. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100 ° С. в течение тридцати минут каждый из трех дней подряд. Это стерилизует раствор, а также выводит углекислый газ, делая раствор нейтральным.

Среды для анаэробных культур. В дополнение к вышеупомянутым средам, все из которых могут быть использованы и используются при культивировании анаэробных бактерий, для этой цели обычно используются определенные специальные среды, содержащие легко окисляемые вещества. Основные из них заключаются в следующем:

Бульон из желчных кислот (макконки).—

1. Взвесьте 20 граммов пептона Витте (= 2%) и сделайте эмульсию с 200 г дистиллированной воды, предварительно подогретой до 60°С.

2. Взвесьте таурохолат натрия (коммерческий) в количестве 5 граммов (= 0,5%) и глюкозу в количестве 5 граммов (= 0,5%) и растворите в пептоновой эмульсии.

3. Перелейте пептоновую эмульсию в колбу с дистиллированной водой температурой 800°С и нагревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение двадцати минут.
4. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу в стерильную колбу.
5. Добавьте стерильный раствор лакмусовой бумажки, достаточный для окрашивания среды в темно-фиолетовый цвет, обычно 13%. обязательно.
6. Налейте в количестве 10 г/л в пробирки, содержащие небольшие газовые трубки (см. рис. 104, стр. 161). Стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С. в течение двадцати минут каждый из трех дней подряд.

Бульон из формиата глюкозы (Китасато).—

1. Отмерьте питательный бульон на 1000 гр. (*смотрите* страницу 163, разделы 1-6).
2. Взвесьте 20 граммов глюкозы (= 2%), 4 грамма формиата натрия (= 0,4%) и растворите в жидкости.
3. Пробуйте и стерилизуйте, как для бульона.

Желатин на формиате глюкозы (Китасато).—

1. Приготовьте питательный желатин (*смотрите* стр. 164, разделы 1-7) и отмерьте 1000 гр.
2. Взвесьте 20 граммов глюкозы (= 2%) и 4 грамма формиата натрия (= 0,4%) и растворите в горячем желатине.
3. Процедите через пюре-шарден.
4. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Глюкозоформиатный агар (Китасато).—

1. Приготовьте питательный агар (*смотрите* страницу 167, разделы 1-8). Отмерьте 1000 °с.
2. Взвесьте 20 граммов глюкозы (= 2%), 4 грамма формиата натрия (= 0,4%) и растворите в агаре.
3. Пробирку стерилизуйте, как для питательного агара.

Бульон с сульфиндиготатом (Вейль).—

1. Отмерьте питательный бульон (*смотрите* страницу 163, разделы 1-6 при температуре 1000 °с).
2. Взвесьте 20 граммов глюкозы (= 2%), 1 грамм сульфиндиготата натрия (= 0,1%) и растворите в жидкости.
3. Пробуйте и стерилизуйте, как для бульона.

Сульфиндиготатный желатин (Вейль).—

1. Приготовьте питательный желатин (*смотрите* страницу 164, разделы 1-7). Отмерьте 1000 °с.

2. Взвесьте 20 граммов глюкозы (= 2%) и 1 грамм сульфиндиготата натрия (= 0,1%) и растворите в горячем желатине.
3. Процедите через пюре-шарден.
4. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Сульфиндиготатный агар.—

1. Приготовьте питательный агар (*смотрите* страницу 167, разделы 1-8). Отмерьте 1000 °с.
2. Взвесьте 20 граммов глюкозы (= 2%), 1 грамм сульфиндиготата натрия (= 0,1%) и растворите в горячем агаре.
3. Пробирку стерилизуйте, как для питательного агара.

Примечание.— Сульфиндиготатная среда имеет синий цвет, который в процессе роста анаэробных бактерий окисляется и обесцвечивается до светло-желтого.

СНОСКИ:

[4] Этот показатель получен путем добавления 1 литра воды, 1000 граммов; 10 процентов. желатин, 100 грамм; 1%. пептон, 10 грамм; 0,5%. соль, 5 грамм; всего 1115 грамм. Модификации вышеуказанного процесса в отношении количеств и процентного соотношения потребуют соответствующих изменений цифр. Средний вес измеренного литра составляет 10%. питательный желатин, приготовленный таким способом, *после фильтрации* составляет 1080 граммов.

[5] Этот показатель получен путем добавления 1 литра воды (мясной экстракт), 1000 граммов; 2 процента. агар, 20 граммов; 1%. пептон, 10 граммов; 0,5%. соль, 5 граммов - всего 1035 граммов. Модификации процесса в отношении количеств или процентного содержания потребуют соответствующих изменений в расчетном среднем показателе. Средний вес измеренного литра составляет 2 процента. приготовленный таким образом агар, *после фильтрации*, составляет 1010,5 грамма.

[6] "Охмеленное" сусло оказывает токсическое действие на многие бактерии, включая молочнокислые.

XII. СПЕЦИАЛЬНЫЕ СРЕДСТВА МАССОВОЙ ИНФОРМАЦИИ.

В этой главе собраны различные средства массовой информации, разработанные различными работниками для специальных целей, сгруппированные под заголовками, которые указывают на их основную полезность. Во многих случаях указывается имя создателя носителя, но без ссылки на его первоначальные инструкции, поскольку они во многих случаях неадекватны требованиям изолированного работника, который, вероятно, не смог бы воспроизвести носитель в форме, дающей результаты, приписываемые ему его автором. Поэтому такие модификации были внесены для обеспечения однородности различных партий носителя.

Было включено значительное количество окрашенных сред, в основном предназначенных для работы с кишечными бактериями; но помимо того факта, что авторская модификация среды Дригальски-Конради была включена в число обычных лабораторных сред, никаких комментариев относительно их относительной ценности сделано не было, поскольку только путем наблюдения и практики можно приобрести навыки, необходимые для использования их в полной мере.

Инструкции по стерилизации редко даются полностью; должен выполняться обычный метод выдержки в паровом стерилизаторе при температуре 100 ° С (без давления) в течение двадцати минут в каждый из трех последовательных дней для всех текучих сред и тридцати минут в каждый из трех последовательных дней для всех жидких или твердых сред; и только при отступлении от этих общих правил даются дополнительные сведения.

Среды для изучения химического состава бактерий.

Спаржа средняя (по—Ущински).-

1. Взвесьте и перемешайте

Аспарагин	3,4 грамма
лактата аммония	10,0 грамма
Хлорида натрия	5,0 грамма
Сульфата магния	0,2 грамма
хлорида кальция	0,1 грамма
кислого фосфата калия (KH_2PO_4)	1,0 грамма

2. Растворите смесь в дистиллированной воде при температуре 100°с.

3. Добавьте глицерин, доведите до 40 °с.

4. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Средняя спаржа (Френкель и Вогес).—

1. Взвесьте и перемешайте

Аспарагин	4 грамма
фосфата натрия, (Na_2HPO_4) 12ОН	2 грамма
лактата аммония	6 граммов
хлорида натрия	5 граммов

и раствориться в

Дистиллированная вода 1000 °с

2. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Примечание.— Любая из вышеупомянутых спарагиновых смесей, после добавления 10% желатина или 1,5% агар может быть предпочтительно использован в твердом состоянии.

Бульон без белков (по—Ущински).-

1. Взвесьте и перемешайте

Хлорид кальция	0,1 грамма
сульфата магния	0,2 грамма
кислого фосфата калия (KH_2PO_4)	2,0 грамма
аспартата калия	3,0 грамма
хлорида натрия	5,0 грамма
лактата аммония	6,0 грамма

2. Растворите смесь в дистиллированной воде при температуре 1000°С.

3. Добавьте глицерин 30 г/л

4. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Среды для изучения биохимической реакции.

Носители без инсайта-Бульон (Дарем).—

1. Приготовьте мясной экстракт при температуре 1000°С (*видео*, стр. 148) из бычьего сердца, которое "висело" пару дней.

2. Приготовьте питательный бульон (+10) при температуре 1000 °С (*видео*, стр. 161) из мясного экстракта и храните в 1-литровой емкости.

3. Инокулируйте бульон из чистой культуры *B. lactis aerogenes* и инкубируйте при 37 ° С в течение сорока восьми часов.

4. Нагревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение двадцати минут, чтобы уничтожить бациллы и некоторые продукты их жизнедеятельности.

5. Оцените реакцию среды и при необходимости восстановите до +10.

6. Инокулируйте бульон из чистой культуры *B. coli communis* и инкубируйте при 37 ° С в течение сорока восьми часов.

7. Разогревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение двадцати минут.

Теперь наполните бульоном две пробирки для брожения, подкрасьте лакмусовой бумажкой и стерилизуйте; инокулируйте *B. lactis aerogenes*. Если кислота или газ не образуются, бульон находится в состоянии без сахара; но если кислота или газ присутствуют, снова приготовьте бульон в колбе с температурой + 10, повторно засейте той или иной из вышеупомянутых бактерий и инкубируйте; затем проведите повторный тест. Повторяйте это до тех пор, пока в среде, используемой для культивирования любой из упомянутых выше бацилл, не исчезнут ни кислота, ни газ.

8. После окончательного нагревания поставьте колбу в прохладное место и дайте росткам отстояться. Отфильтруйте надсадочный бульон через шведскую фильтровальную бумагу. Если фильтрат мутный, процедите через фарфоровую фильтровальную свечу.

9. Пробуйте и стерилизуйте, как для бульона.

Бульон, приготовленный описанным выше способом, окажется абсолютно без сахара; и из него можно приготовить питательный желатин или агар без сахара, растворив в нем требуемый процент желатина или агара соответственно и приготовив питательную среду в соответствии с указаниями, приведенными на страницах 166 и 167. Наиболее важным применением бульона без инозитов является его использование при приготовлении бульонов с сахаром, будь то глюкоза, мальтоза, лактоза или сахарозы, с точным процентным содержанием.

Сахар (декстроза) Bouillon.—

1. Отмерьте питательный бульон до 1000 гр. (*смотрите* стр. 163, разделы 1-6) или бульон без сахара (*смотрите выше*).
2. Взвесьте 20 граммов глюкозы (безводной) (= 2%) и растворите в жидкости.
3. Пробуйте и стерилизуйте, как для бульона.

Обычная коммерческая глюкоза одинаково хорошо подходит для этой цели, но не рекомендуется, поскольку в процессе стерилизации она приводит к постепенному углублению цвета среды.

Примечание.—В некоторых случаях глюкозу заменяют соответствующим процентным содержанием лактозы, мальтозы или сахарозы.

Сахарный желатин.—

1. Приготовьте питательный желатин (*смотрите* страницу 164, разделы 1-7). Отмерьте 1000 °с.
2. Взвесьте 20 граммов глюкозы (= 2%) и растворите в горячем желатине.
3. Процедите через пюре-шарден.
4. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Сахарный агар.—

1. Приготовьте питательный агар (*смотрите* страницу 167, разделы 1-8). Отмерьте 1000 °с.
2. Взвесьте 20 граммов глюкозы (= 2%) и растворите в прозрачном агаре.
3. Пробирку стерилизуйте, как для питательного агара.

Примечание.—Другие "сахарные" среды готовятся путем замены глюкозы соответствующим процентным содержанием лактозы, мальтозы (или любого другого вещества, указанного в разделе "Сахарные среды", стр. 177).

Железный бульон.—

1. Отмерьте питательный бульон на 1000 гр. (*смотрите* страницу 141, разделы 1-6).
2. Взвесьте тартрат железа в количестве 1 грамма (= 0,1%) и растворите его в бульоне.
3. Пробуйте и стерилизуйте, как для бульона.

Примечание.—Тартрат железа может быть заменен лактатом.

Свинцовый бульон.—

1. Отмерьте питательный бульон на 1000 гр. (*смотрите* страницу 163, разделы 1-6).
2. Взвесьте 1 грамм ацетата свинца (= 0,1%) и растворите его в бульоне.
3. Пробуйте и стерилизуйте, как для бульона.

Бульон с нитратами.—

1. Отмерьте питательный бульон на 1000 гр. (*смотрите* страницу 163, разделы 1-6).
2. Взвесьте 5 граммов нитрата калия (= 0,5%) и растворите его в бульоне.
3. Пробуйте и стерилизуйте, как для бульона.

Примечание.—Нитрат натрия или аммония может быть заменен нитратом калия или может быть добавлена соль в пропорции от 0,1 до 1%. для удовлетворения особых требований.

Раствор пептона железа (Pakes).—

1. Взвесьте 30 граммов пептона и эмульгируйте его в 200-градусной водопроводной воде, предварительно нагретой примерно до 60°C.
2. Перелейте эмульсию в литровую колбу с водопроводной водой температурой 800 °C.
3. Взвесьте 5 граммов соли и 3 грамма фосфата натрия и растворите в смеси в колбе.
4. Нагревайте смесь в пароварке при температуре 100°C в течение тридцати минут, чтобы пептон полностью растворился, и отфильтруйте в чистую колбу.
5. Разлейте по пробиркам в количестве по 10 г в каждую.
6. Добавьте в каждую пробирку по 0,1 ч.л. 2%-ного раствора нейтрального тартрата железа. (Образуется желтовато-белый осадок.)
7. Стерилизуйте, как для приготовления питательного бульона.

Раствор свинцового пептона.—

Приготовьте так же, как для раствора пептона железа, но на этапе 6 замените 0,1%-ный раствор 1%-ного. нейтральный водный раствор ацетата свинца.

Раствор нитратпептона (Pakes).—

1. Взвесьте 10 граммов пептона Витте и эмульгируйте его дистиллированной водой, не содержащей аммиака, при температуре 200°C, предварительно нагретой до 60°C.
2. Перелейте эмульсию в колбу и доведите до 1000°с дистиллированной водой, не содержащей аммиака.
3. Разогревайте в пароварке при температуре 100 ° C в течение двадцати минут.

4. Взвесьте 1 грамм нитрата натрия и растворите в содержимом колбы.
5. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу.
6. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Лакмусовый бульон.—

1. Отмерьте питательный бульон на 1000 гр. (*смотрите* страницу 163, разделы 1-6).
2. Добавьте достаточное количество стерильного раствора лакмусовой бумажки, чтобы среда приобрела темно-лавандовый цвет. (Среда, обработанная +10, обычно реагирует на лакмусовую бумажку очень слабо щелочной или иногда нейтральной реакцией.)
3. Пробуйте и стерилизуйте, как для бульона.

Раствор пептона розоловой кислоты.—

1. Взвесьте розоловую кислоту (кораллин) в количестве 0,5 грамма и растворите ее на 80% спирт, 100 гр.с. Храните это как исходный раствор.
2. Отмерьте пептоновую воду (Dunham) при 100°с и раствор розоловой кислоты при 2°с и перемешайте.
3. Разогревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение тридцати минут.
4. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу.
5. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Медиум Капальди-Проскауэра, № I.—

1. Взвесьте и перемешайте

Хлорид натрия	2,0 грамма
сульфата магния	0,1 грамма
хлорида кальция	0,2 грамма
монокальцийфосфата	2,0 грамма

2. Растворите в воде при температуре 1000°с в 2-литровой колбе

3. Взвесьте и перемешайте

Аспарагин	2 грамма
Маннит	2 грамма

и добавьте к содержимому колбы.

4. Отмерьте 25°с раствора и титруйте его по отношению к децинормальному содержанию гидрата натрия, используя лакмусовую бумажку в качестве индикатора. Проконтролируйте результат и оцените количество гидрата натрия, которое необходимо добавить, чтобы сделать

остаток раствора нейтральным по отношению к лакмусу. Добавьте указанное количество гидрата натрия.

5. Фильтр.

6. Добавьте раствор лакмусовой бумажки 47,5°с (= 5%).

7. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Средство Капельди-Проскауэра № II.—

1. Взвесьте и перемешайте

Пептон 20 грамм

Маннит 1 грамм

2. Растворите в воде при температуре 100°с в 2-литровой колбе.

3. Нейтрализуйте лакмусовой бумажкой, как в № I (см. выше, Шаг 4).

4. Фильтр.

5. Добавьте раствор лакмусовой бумажки 47,5°с (= 5%).

6. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Среда для анализа мочи. Bouillon.—

1. Соберите свежую мочу в стерильную колбу.

2. Поставьте колбу в пароварку при температуре 100°С на тридцать минут.

3. Отфильтруйте через шведскую фильтровальную бумагу двух толщин.

4. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона. (Оставьте реакцию неизменной.)

Желатин в моче.—

1. Соберите свежую мочу в стерильную колбу.

2. Измерьте удельный вес и, если он выше 1010, разбавьте стерильной водой до достижения указанного значения.

3. Оцените (с контролем) температуру кипения и обратите внимание на реакцию мочи.

4. Взвесьте 10% желатина и добавьте к моче в колбе.

5. Нагревайте в пароварке при температуре 100 ° С. в течение одного часа, чтобы желатин растворился.

6. Оцените реакцию и добавьте достаточное количество раствора каустической соды, чтобы восстановить реакцию средней массы до эквивалента исходной мочи.

7. Остудите до 60°С. и взбейте с яйцом, как для получения питательного желатина (видео, стр. 166).

8. Процедите через пюре-шарден.
9. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Желатин в моче (Хеллер).—

1. Соберите свежую мочу в стерильную колбу.
2. Отфильтруйте древесный уголь животного происхождения, чтобы удалить часть красящих веществ.
3. Измерьте удельный вес и, если он выше 1010, разбавьте стерильной водой до достижения этого значения.
4. Добавьте 1% пептона Витте, 0,5% соли и 10% желатина.
5. Нагревайте в пароварке при температуре 100 ° С. в течение одного часа, чтобы желатин растворился и т.д.
6. Добавляйте обычный раствор каустической соды небольшими порциями и время от времени проверяйте реакцию лакмусовой бумажкой, пока жидкость не станет слегка щелочной.
7. Остудите до 60°C. и взбейте с яйцом, как для получения питательного желатина (*видео*, стр. 166).
8. Процедите через пюре-шарден.
9. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Мочевой агар.—

1. Соберите свежую мочу в стерильную колбу.
 2. Измерьте удельный вес и, если он выше 1010, разбавьте стерильной водой до достижения этого значения.
 3. Весить на 1,5 процента. или на 2 процента. порошкообразный агар и добавить его в моче.
 4. Нагревайте в пароварке при температуре 100 ° С. в течение девяноста минут, чтобы агар растворился.
 5. Остудите до 60°C и смешайте с яйцом, как для приготовления питательного агара (*видео*, стр. 168).
 6. Процедите через папье-шарден, используя воронку для горячей воды.
 7. Пробирку стерилизуйте, как для питательного агара.
- (Оставьте реакцию без изменений.)

Среда с сахаром в сыворотке (шипение).—

В этих средах на ферментацию углеводного вещества под действием бактерий указывает коагуляция сывороточных протеидов в дополнение к возникновению кислой реакции.

Сывороточная декстрозная вода (шипение).—

1. Отмерьте в литровую колбу

Сывороточная вода (см. стр. 170) при температуре 1000 °с

2. Взвесьте

Декстроза 10 грамм

и растворите сыворотку в воде.

3. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу.

4. Отмерьте и добавьте в среду

Лакмусовая бумажка (Кальбаум) 50 °с

5. Разлейте по 10 стаканам и стерилизуйте в пароварке при температуре 100°С в течение двадцати минут каждый из трех последующих дней.

Декстрозу и готовую среду можно заменить левулозой, галактозой, мальтозой, лактозой и т.д. В аналогичных количествах, как указано выше.

Питательная жидкость Омелянского (Для ферментаторов целлюлозы).—

1. Взвесьте и перемешайте

Фосфат калия 4,0 грамма

сульфат магния 2,0 грамма

сульфат аммония 4,0 грамма

Хлорид натрия 0,25 грамма

2. Растворите в дистиллированной воде при температуре 4000 °с.

3. Колба в количестве 250 гр.

4. Взвесьте и добавьте в каждую колбу по 5 граммов осажденного мела.

5. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С. в течение двадцати минут каждый из трех последующих дней.

Среды для изучения хромогенных бактерий.

Рис с молоком (Айзенберг).—

1. Отмерьте питательный бульон (70 гр.) и молоко (210 гр.) и тщательно перемешайте.

2. Взвесьте 100 граммов рисового порошка и разотрите его в ступке со смесью молока и бульона.

3. Разлейте пасту по стерильным капсулам, распределив ее так, чтобы образовался слой толщиной около 0,5 см на дне каждой.
4. Нагревайте на водяной бане при температуре 100 ° С. Пока смесь не затвердеет.
5. Закройте капсулы крышками. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100 ° С в течение тридцати минут каждый из трех дней подряд.

(Таким образом получается густая масса цвета *кофе с молоком*.)

Рис с молоком (сойка).—

1. Отмерьте питательный бульон (50 гр.) и молоко (150 гр.) и тщательно перемешайте.
2. Взвесьте 100 граммов рисового порошка и разотрите его в ступке со смесью молока и бульона.
3. Разлейте пасту по стерильным капсулам, чтобы образовался слой на дне каждой.
4. Закройте капсулы крышками.
5. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С. в течение тридцати минут каждый из трех дней подряд.

(Таким образом образуется чисто белая непрозрачная среда.)

Среды для изучения фосфоресцирующих и фотогеничных бактерий.

Рыбный бульон.—

1. Взвесьте сельдь, скумбрию или треску весом 500 граммов и положите в большой фарфоровый стакан (или железную эмалированную кастрюлю).
2. Взвесьте хлорид натрия (26,5 грамма), хлорид калия (0,75 грамма), хлорид магния (3,25 грамма) и растворите в дистиллированной воде при температуре 500 °с. Добавьте раствор к рыбе в мензурке.
3. Поставьте стакан на водяную баню и действуйте, как при приготовлении мясного экстракта - *т.е.* Слегка нагревайте при температуре 40 ° С в течение двадцати минут, затем быстро поднимите температуру до температуры кипения и поддерживайте ее в течение десяти минут.
4. Процедите смесь через промасленный муслин в чистую колбу.
5. Взвесьте 5 граммов пептона и сделайте эмульсию примерно с 200 градусами горячей воды для рыбы; тщательно перемешайте с оставшейся в колбе водой для рыбы.
6. Нагревайте в пароварке при температуре 100° С в течение двадцати минут до полного растворения пептона.
7. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу.
8. Когда рыбный бульон остынет, если его предполагается использовать в качестве жидкой среды, доведите температуру до 1000 °с, добавив дистиллированную воду. Однако, если он

будет использоваться в качестве основы для агаровой или желатиновой среды, храните его в состоянии "Двойной крепости".

9. Разлейте по трубочкам и стерилизуйте, как для питательного бульона.

В качестве альтернативного метода 500 граммов свежей рыбы можно заменить рыбным кормом "Марвис" (16 граммов).

Рыбный желатин.—

1. Отмерьте рыбный бульон двойной крепости, 500 гр., в тарированную 2-литровую флягу.
2. Добавьте листовой желатин, 100 грамм, нарезанный небольшими кусочками.
3. Взбивайте смесь под давлением в течение пятнадцати минут, чтобы желатин растворился.
4. Взвесьте колбу и ее содержимое; приведите вес к расчетному показателю для одного литра среды (1135,5 грамма) путем добавления дистиллированной воды при температуре 100°C. (видео, стр. 166).
5. Остудите до температуры ниже 60°C и взбейте с яйцом.
6. Процедите через пюре-шарден.
7. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

После окончательной стерилизации хорошо встряхните, чтобы проветрить среду.

Рыбный желатин-агар.—

1. Взвесьте 5 граммов порошкообразного агара и эмульгируйте его рыбным бульоном двойной крепости при 200 °с.
2. Перелейте эмульсию в "тарированную" 2-литровую колбу с рыбным бульоном на 300°с.
3. Взвесьте листовой желатин, 70 грамм, нарежьте его небольшими кусочками и добавьте к содержимому колбы.
4. Пропустите смесь под давлением, чтобы растворить желатин и агар.
5. Взвесьте колбу и ее содержимое. Доведите вес до расчетного значения для одного литра среды (1110,5 грамма), добавив дистиллированную воду при температуре 100°C. (смотрите стр. 166).
6. Остудите до температуры ниже 60 ° С и взбейте с яйцом.
7. Процедите через пюре-шарден.
8. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

После окончательной стерилизации хорошо встряхните, чтобы проветрить среду.

Среды для исследования дрожжей и плесневых грибов.

Раствор Пастера.—

(Реакция щелочная).

1. Взвесьте и смешайте золу от 10 граммов дрожжей; тартрат аммония - 10 граммов; тростниковый сахар - 100 граммов.
2. Растворите смесь в дистиллированной воде при температуре 1000°с.
3. Пробирку или колбу стерилизуйте, как для питательного бульона.

Дрожжевая вода (пастеровская).—

1. Взвесьте прессованные дрожжи, 75 грамм; поместите в 2-литровую колбу и добавьте 1000 г дистиллированной воды.
2. Разогревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение тридцати минут.
3. Процедите через пюре-шарден.
4. Пробирку или колбу стерилизуйте, как для питательного бульона.

Решение Кона.—

1. Взвесьте и перемешайте

Кислый фосфат калия (KH_2PO_4)	5,0 грамма
фосфата кальция	0,5 грамма
сульфата магния	5,0 грамма
тартрата аммония	10,0 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 1000 °с

2. Пробирку или колбу простерилизуйте, как для питательного бульона.

Решение Негели.—

1. Взвесьте и перемешайте

Двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4)	1,0 грамм
Сульфата магния	0,2 грамма
хлорида кальция	0,1 грамма
тартрата аммония	10,0 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 1000 °с

2. Тюбик или колбу стерилизовать, как для питательного бульона.

Гипсовые диски из Парижа.-

1. Возьмите большие пробки диаметром 2,5 см, оберните каждую листом плотной почтовой бумаги так, чтобы выступ примерно на сантиметр выступал над верхней поверхностью пробки, и закрепите булавкой (рис. 112).
2. Смешайте парижскую штукатурку с дистиллированной водой в густую массу и заполните этой массой каждую пробковую форму.
3. Когда штукатурка застынет, снимите бумагу с пробок и поднимите пластыри.
4. Положите гипсовые диски на кусок асбестовой плиты и стерилизуйте в духовке с горячим воздухом при температуре 150 ° C в течение получаса.

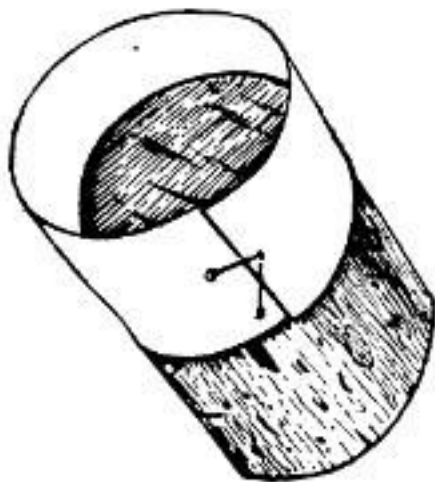


Рис. 112. Форма из пробки и бумаги для гипсового диска.

5. Извлеките стерильные диски из духовки с помощью стерильных щипцов, поместите каждый в стерильную капсулу и смочите небольшим количеством стерильной воды.
6. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100° C. в течение тридцати минут каждый из трех дней подряд.

Гипсовые блоки (Энгель и Хансен).—

Они имеют форму усеченных конусов, и для их приготовления требуются небольшие жестяные формочки, каждая диаметром 5,5 см у основания и 4 см у усеченной вершины. Высота (или глубина) формы составляет от 4,5 до 5 см.

1. Измельченный кальцинированный гипс смешайте с дистиллированной водой в густую пасту.
2. Разлейте пасту по формам и дайте ей застыть и высохнуть на воздухе.
3. Выньте брусочек из формы и переложите его в двойную стеклянную форму соответствующего размера (7 см в диаметре × 7 см в высоту).
4. Стерилизуйте брусочек в форме в течение часа в духовке с горячим воздухом при температуре 115°С.
5. Осторожно откройте форму и налейте стерильную дистиллированную воду, чтобы смочить брусок и сформировать слой на дне формы глубиной 1 см.

Винное сусло.—(Винное сусло получают с Сицилии в герметично закрытых банках в высококонцентрированной форме — в виде густого сиропа — но не стерилизуют.)

1. Взвесьте "винное сусло" в количестве 200 граммов, поместите в 2-литровую колбу и добавьте дистиллированную воду при температуре 800 °С.
2. Взвесьте 5 граммов тартрата аммония и добавьте в разбавленное сусло.
3. Поместите колбу на водяную баню с температурой 60°C на один час и тщательно перемешайте смесь путем частого встряхивания.
4. Процедите через пюре-шарден.
5. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Пшеничный бульон (Гасперини).—

1. Взвесьте и смешайте пшеничную муку (150 г), сульфат магния (0,5 г), нитрат калия (1 г), глюкозу (15 г).
2. Растворите смесь в 1000 мл воды, нагретой до 100°C.
3. Процедите через пюре-шарден.
4. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Хлебная паста.—

1. Черствый хлеб мелко натрите на хлебной терке.
2. Распределите крошки по стерильным колбам Эрленмейера таким образом, чтобы на дне каждой образовался слой толщиной около сантиметра.
3. Добавьте столько дистиллированной воды, сколько впитают крошки, но не столько, чтобы покрыть хлеб.
4. Закупорьте колбы и стерилизуйте в пароварке при температуре 100°C в течение тридцати минут каждый из *четырёх* дней подряд.

Среды для исследования паразитических плесневых грибов.

Французский прованский агар (Сабуро).—

1. Взвесьте 10 граммов пептона Шассена и эмульгируйте его с 200 г дистиллированной воды, предварительно нагретой до 60°C.
2. Взвесьте 13 граммов порошкообразного агара и разведите в эмульсии холодной дистиллированной водой при температуре 200 °с.
3. Смешайте две эмульсии и перелейте в тарированную 2-литровую колбу с 600-градусной дистиллированной водой.
4. Пропускайте горячий пар через смесь в течение двадцати минут, чтобы агар растворился.

5. Охладите до 60°C и смешайте с яйцом, как для приготовления питательного агара (*видео*, стр. 168).

6. Процедите через папье-шарден, используя воронку для горячей воды.

7. Взвесьте *французскую* мальтозу, 40 граммов, и растворите в агаре.

8. Пробирку стерилизуйте, как для питательного агара.

Английский пробный агар (Блаксолл). Замените пептон Шассена пептоном Витте и действуйте так же, как для французского агара proof.

Французский маннитовый агар, Сабуро.—(*Для выращивания фавуса.*)

Действуйте точно так же, как при приготовлении агара французской выдержки, *см. выше*, заменив мальтозу маннитом (38 граммов).

Среды для исследования молочных бактерий.

Желатиновый агар.—Эту среду готовят путем добавления к питательному желатину достаточного количества агара для обеспечения плотности среды при инкубации при температуре выше 22 ° C. Если предполагается использовать температуру инкубации 30°C, добавьте 10%. желатина - 0,5%. агар необходимо растворить в мясном экстракте перед добавлением пептона и соли; при инкубации при 37°C - 12%. желатина - 0,75%. необходимо использовать агар. Избегайте добавления большего количества агара, чем это абсолютно необходимо, в противном случае воздействие на среду таких организмов, которые вырабатывают разжижающую закваску, может замедлиться или полностью отсутствовать.

1. Отмерьте мясной экстракт двойной крепости 400 гр. в "тарированную" 2-литровую миску и добавьте к нему желатин (100 гр.).

2. Взвесьте 5 граммов порошкообразного агара, разведите 100 г холодной дистиллированной воды и добавьте к содержимому колбы.

3. Растворите агар и желатин, пропуская горячий пар через колбу в течение двадцати минут.

4. Взвесьте 10 граммов пептона; 5 граммов соли; сделайте эмульсию с добавлением мясного экстракта двойной крепости, предварительно подогретого до 60°C, и добавьте к содержимому колбы.

5. Поставьте в пароварку на пятнадцать минут. Затем доведите вес до расчетного значения для одного литра (в данном случае 1120 граммов) путем добавления дистиллированной воды при температуре 100 °C.

6. Оцените реакцию; контролируйте результат. Затем добавьте достаточное количество раствора каустической соды для усиления реакции +10.

7. Поставьте в пароварку при температуре 100 ° C на двадцать минут.

8. Остудите до 60 ° C. Добавьте яйцо, как для приготовления питательного агара.

9. Процедите через папье-шарден, используя воронку для горячей воды.

10. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Желатиновый агар (Гварньяри).—

1. Отмерьте мясной экстракт двойной крепости (400 г) в "тарированную" 2-литровую банку и добавьте к нему желатин (50 г).
2. Взвесьте 3 грамма порошкообразного агара; разведите холодной дистиллированной водой при 50°С и добавьте к содержимому колбы.
3. Растворите агар и желатин, пропуская горячий пар через колбу в течение двадцати минут.
4. Взвесьте 25 граммов пептона Витте, 5 граммов соли и эмульгируйте при 100 °С мясным экстрактом двойной крепости, предварительно нагретым до 60 °С, и добавьте к содержимому колбы.
5. Поставьте в пароварку на пятнадцать минут.
6. Взвесьте колбу и доведите среднюю массу до расчетного показателя для одного литра (1083 грамма) путем добавления дистиллированной воды при температуре 100°С.
7. Тщательно нейтрализуйте лакмусовую бумажку путем последовательного добавления небольших количеств обычного содового раствора.
8. Поставьте в пароварку при температуре 100 ° С на двадцать минут.
9. Остудите до 60 ° С. Смешайте с яйцом, как для приготовления питательного агара.
10. Процедите через папье-шарден, используя воронку для горячей воды.
11. Пробирку стерилизуйте, как для питательного агара.

Сывороточный желатин.—

1. Свежее молоко сверните, подогрев до 60 ° С и добавив сычужный фермент; сыворотку отфильтруйте в стерильную тарированную колбу.
2. Оцените и запишите реакцию сыворотки.
3. Взвесьте 10% желатина и добавьте его в сыворотку в колбе.
4. Выпаривайте смесь под давлением пятнадцать минут, чтобы желатин растворился, и взвесьте.
5. Оцените реакцию средней массы; затем добавьте достаточное количество раствора каустической соды, чтобы восстановить реакцию средней массы (*т.е.* Общий вес минус вес колбы) до эквивалента исходной сыворотки.
6. Остудите до 60°С. и взбейте с яйцом, как для получения питательного желатина (*видео*, стр. 166).
7. Процедите через пюре-шарден.
8. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Сывороточный агар.—

1. Свежее молоко сверните, подогрев до 60 ° С и добавив сычужный фермент; сыворотку отфильтруйте и перелейте в стерильную колбу.
2. Взвесьте 1,5- или 2%-ный агар и добавьте его в сыворотку в колбе.
3. Пропускайте горячий пар через смесь в течение двадцати минут, чтобы агар растворился.
4. Остудить до 60°C; смешать с яйцом, как для приготовления питательного агара (*видео*, стр. 168).
5. Процедите через папье-шарден, используя воронку для горячей воды.
6. Пробирку стерилизуйте, как для питательного агара.

Лакмусовая сыворотка.—

1. Сверните свежее молоко, подогрев до 60 ° С и добавив сычужный фермент.
2. Отфильтруйте сыворотку через масляную салфетку в стерильную колбу.
3. Нейтрализуйте лакмусовую бумажку осторожным добавлением 4-процентного раствора лимонной кислоты. (Не нейтрализуйте *минеральной* кислотой.)
4. Нагревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение одного часа, чтобы весь белок свернулся.

(Если при извлечении из пароварки сыворотка помутнеет, дайте ей постоять сорок восемь часов в холодильнике, а затем слейте прозрачную жидкость - или процедите через фильтр—свечу Berkefeld.)

5. Отфильтруйте в стерильную колбу.
6. Подкрасьте сыворотку лакмусовой бумажкой в темно-фиолетовый цвет.
7. Пробуйте и стерилизуйте, как для молока.

Лакмусовая сыворотка (Петрушки).—

1. Отмерьте в колбу

Свежее молоко 1000 гр.

2. Добавить

Соляная кислота (или ледяная уксусная кислота) 1,5 с.с.

и вскипятить.

3. Отфильтруйте свернувшийся казеин.

4. Нейтрализуйте до лакмусовой бумажки, добавив $n / 1$ раствора каустической соды, и прокипятите. Сыворотка снова станет мутной и кислой.
5. Снова нейтрализуйте лакмусовую бумажку добавлением $n/10$ раствора едкого натра.
6. Фильтр.
7. Подкрасьте сыворотку нейтральным лакмусовым раствором до темно-фиолетового цвета.
8. Пробуйте и стерилизуйте, как для молока.

Лакмусовая желатиновая сыворотка.—

1. Отмерьте молоко при температуре 100°C в тарированную 2-литровую колбу.
 2. Добавьте соляную кислоту (или ледяную уксусную кислоту) на $1,5$ градуса и кипятите в течение пяти минут.
 3. Отфильтруйте казеин и сделайте сыворотку слегка щелочной, до лакмусовой.
 4. Взвесьте
Пептон 10 грамм
затем эмульгируйте в нескольких кубических сантиметрах сыворотки и верните в колбу.
 5. Взвесьте
Желатин 50 грамм
добавьте его в сыворотку в колбе и взбейте смесь с помощью горячего пара.
 6. Смажьте яйцом и процедите.
 7. Доведите массу средней массы до расчетного показателя для одного литра (1060 граммов) путем добавления дистиллированной воды.
 8. Взвесьте
Декстроза 15 грамм
и растворите в жидкой сыворотке желатин.
 9. Добавьте стерильный лакмусовый раствор для придания требуемого оттенка.
 10. Запечатйте и стерилизуйте в течение двадцати минут в пароварке при температуре 100°C каждый из пяти последующих дней.
- Эта среда остается полужидкой при комнатной температуре и может использоваться для выращивания культур в холодном или горячем инкубаторе.

Лакмусовый сывороточный агар готовят аналогично сывороточному желатину, с заменой желатина 15 граммами агара.

Раствор солодового экстракта (Herschell).—

1. Отмерьте в колбу дистиллированную воду на 1000°с.

2. Взвесьте

Extractum malti (солодовый экстракт) 25 грамм

и добавьте в дистиллированную воду в колбе.

3. Кипятите в течение пяти минут, дайте настояться и слейте прозрачную жидкость с осадка.

4. Разлейте по трубочкам и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Среды для изучения земных бактерий, азотфиксаторы.

Агар с землистыми солями (Липмана и Брауна).—(Для перечисления почвенных организмов.)

1. Отмерьте

Agar 20 grammes.

Эмульгировать в дистиллированной воде при температуре 200°с.

2. Промойте эмульсию агара в тарированной 2-литровой колбе 400-градусной дистиллированной водой.

3. Взвесьте

Пептон 0,5 грамма

Эмульгировать в 50°с дистиллированной воды и добавить к содержимому колбы.

4. Пропускайте горячий пар через смесь в течение двадцати минут, чтобы агар растворился.

5. Взвесьте и перемешайте

Декстроза 10,0 грамма.

Фосфат калия 0,5 грамма.

Сульфат магния 0,2 грамма.

Нитрат калия 0,06 грамма

и добавьте к содержимому колбы.

6. Доведите вес средней массы до расчетного показателя для одного литра (1025 граммов) путем добавления дистиллированной воды при температуре 100°С.

7. Титруйте среднюю массу и отрегулируйте реакцию на +5.

8. Остудите до 60°С. Взбейте с яйцом и процедите.

9. Разлейте по 10 стаканам и стерилизуйте, как для питательного агара.

Решение Бейринка. I.—(Для культивирования азотфиксирующих организмов.)

1. Взвесьте и смешайте 1 грамм гидрофосфата калия, 0,2 грамма сульфата магния и 0,02 грамма хлорида натрия.
2. Растворите в воде при температуре 1000°с в 2-литровой колбе.
3. Добавьте 1 ч.л. водного раствора сульфата железа один на тысячу.
4. Добавьте 1 ч.л. раствора сульфата марганца один на тысячу.
5. Взвесьте 20 граммов декстрозы и добавьте к содержимому колбы (для различных организмов можно использовать до 40 граммов декстрозы).
6. Готовьте на пару в течение двадцати минут, процедите.
7. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Решение Бейринка. II.—(Для роста *Azobacter*.)

Действуйте, как при приготовлении раствора №. I, заменив декстрозу маннитом на этапе 5.

Раствор Виноградского (для азотистых организмов).—

1. Взвесьте и перемешайте.

Фосфат калия	1,0 грамм
сульфата магния	0,5 грамма
хлорида кальция	0,01 грамма
хлорида натрия	2,0 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 1000 °с

2. Разлейте по колбам в количестве 20 гр. и добавьте в каждую небольшое количество свежесмытого карбоната магния.
3. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С. в течение двадцати минут каждый из трех дней подряд.
4. Добавьте в каждую колбу, содержащую 20-градусный раствор, по 2 градуса стерильного 2-процентного раствора. раствора сульфата аммония.
5. Инкубируйте при 37 ° С в течение сорока восьми часов, а все загрязненные колбы с культуральными препаратами удалите. Остальное сохраните для использования в будущем.

Раствор Виноградского (для азотистых организмов).—

1. Взвесьте и перемешайте

Сульфат аммония 1 грамм

сульфат калия 1 грамм

и раствориться в

Дистиллированная вода 1000 °с

2. Добавьте 5-10 граммов основного карбоната магния, предварительно стерилизованного кипячением.

3. Разлейте по колбам и стерилизуйте и т.д., как для предыдущего раствора.

Силикатное желе (Виноградский).—

1. Взвесьте и перемешайте

Сульфат аммония 0,40 грамма

сульфат магния 0,05 грамма

хлорид кальция 0,01 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 50 °с

Этикетка—Раствор А.

2. Взвесьте и перемешайте

Фосфат калия 0,10 грамма

карбонат натрия 0,60 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 50 °с

Этикетка—Решение В.

3. Взвесьте

Кремниевая кислота 3,4 грамма

и раствориться в

Дистиллированная вода 100 °с

4. Налейте раствор кремниевой кислоты в большой фарфоровый таз.

5. Смешайте равные количества растворов А и В; затем последовательно добавляйте небольшие количества смешанных солей в раствор кремниевой кислоты, непрерывно помешивая стеклянной палочкой, пока не образуется желе достаточно плотной консистенции.

6. Распределите слой этого желе по дну каждой из нескольких больших капсул или "тарелочек".

7. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100 ° С. в течение тридцати минут каждый из трех дней подряд.

Среды для исследования водных бактерий.

Агар Нэрстоффа (Гессен и Ниднер).—(Для перечисления водных организмов.)

1. Взвесьте: 12,5 грамма агара и разведите в эмульсии при 250°с дистиллированной воды.
2. Перелейте эмульсию агара в тарированную 2-литровую колбу с добавлением еще 250°с дистиллированной воды.
3. Растворите смесь, пропуская через нее горячий пар.
4. Эмульгируйте 7,5 грамма Нэрстофф-Хейдена (альбумозы) в 200 г холодной дистиллированной воды и добавьте к растопленному агару.
5. Доведите массу средней массы до расчетного показателя для одного литра (1020 граммов) путем добавления дистиллированной воды при температуре 100°С.
6. Взбейте с яичным белком и процедите.
7. Разлейте по 10 стаканам и стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С в течение двадцати минут каждый из трех последующих дней.

Бульон из желчных кислот—Двойной крепости.—

1. Взвесьте 40 граммов пептона Витте и сделайте эмульсию с 300 г дистиллированной воды, предварительно подогретой до 60°С.
2. Промойте пептоновую эмульсию в литровой колбе 600-градусной дистиллированной водой.
3. Взвесьте таурохолат натрия (10 г) и глюкозу (10 г); растворите в дистиллированной воде при 100°с и добавьте к пептоновой эмульсии в колбе.
4. Разогревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение двадцати минут.
5. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу в стерильную колбу.
6. Добавьте стерильный нейтральный раствор лакмусовой бумажки, достаточный для окрашивания среды в темно-фиолетовый цвет.
7. Разлейте по небольшим колбам Эрленмейера в количестве 25 гр.
8. Стерилизуйте, как для приготовления питательного бульона.

Среды для изучения растительных бактерий.

Свекла.— }

Морковь.— } готовятся в трубочках и стерилизуются точно так же, как

репа.— } аналогично описанному для картофеля.

Пастернак.— }

Настой сена.—

1. Взвесьте 10 граммов сухого сена, измельчите его на мелкие частицы и положите в колбу.
2. Добавьте 1000°с дистиллированной воды, нагретой до 70 °С; закройте колбу прочной резиновой пробкой.
3. Мацерируйте на водяной бане при температуре 60° С в течение трех часов.
4. Закройте пробку пробкой из ваты и нагревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение одного часа.
5. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу.
6. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Бульон из фасоли.—*(Для культивирования бактерий из клубеньков бобовых.)*

1. Отмерьте дистиллированную воду на 1000°с в 2-литровую колбу.
2. Взвесьте 250 граммов фасоли и добавьте в воду в термосе.
3. Взвесьте 10 граммов хлорида натрия и добавьте к содержимому колбы.
4. Добавьте 1 ч.л. 1%-ного раствора бикарбоната натрия.
5. Поставьте в пароварку при температуре 100 ° С на тридцать минут.
6. Фильтр.
7. Взвесьте 20 граммов сахарозы и добавьте к фильтрату.
8. Пробуйте и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Фасолевый агар.—

1. Отмерьте 400°с дистиллированной воды в тарированную 2-литровую колбу.
2. Взвесьте 15 граммов агара, смешайте в густую пасту с 100 г холодной дистиллированной воды и добавьте в колбу.
3. Растворите агар, пропуская через смесь горячий пар, как при приготовлении питательного агара.
4. Взвесьте 250 граммов фасоли, положите в колбу с агаровой смесью.
5. Добавьте 1 ч.л. 1%. водного раствора бикарбоната натрия.
6. Взвесьте 10 граммов хлорида натрия и добавьте к содержимому колбы.
7. Поставьте в пароварку при температуре 100 ° С на тридцать минут.
8. Доведите вес средней массы до 1030 граммов (показатель на литр, полученный экспериментально) путем добавления дистиллированной воды при температуре 100°С.

9. Остудите до 60°C, взбейте с яйцом и процедите.
10. Взвесьте 20 граммов сахарозы и добавьте к содержимому колбы.
11. Пробирку и стерилизуйте, как для питательного агара.

Агар из древесной золы.—

1. Отмерьте 400°с дистиллированной воды в тарированную 2-литровую колбу.
2. Взвесьте 10 граммов агара и доведите до состояния густой пасты с добавлением 100 г холодной дистиллированной воды.
3. Добавьте эту агаровую пасту в дистиллированную воду в колбе.
4. Растворите агар, пропустив через него горячий пар, как при приготовлении питательного агара.
5. Взвесьте 5 граммов чистой древесной золы и поместите во вторую колбу, содержащую 200 °с дистиллированной воды, с добавлением нескольких стерильных стеклянных шариков: тщательно встряхивайте в механическом шейкере в течение десяти минут.
6. Разогревайте в пароварке при температуре 100 ° С в течение тридцати минут.
7. После извлечения из пароварки тщательно высушите колбу снаружи, поставьте ее на огонь Бунзена и кипятите в течение одной минуты.
8. Отфильтруйте непосредственно в колбу с расплавленной смесью агара.
9. Взвесьте 4 грамма мальтозы. Добавьте к содержимому колбы.
10. Доведите вес средней массы до расчетного показателя для одного литра (1019 граммов) путем добавления дистиллированной воды при температуре 100°C.
11. Поставьте колбу в пароварку на двадцать минут, остудите до 60°C, взбейте с яйцом и процедите.
12. Пробирку и стерилизуйте, как для питательного агара.

Среды для изучения особых бацилл.

В. Угри.

Агар с олеиновой кислотой (Флеминг).—

1. Отмерьте в стерильную прочную стеклянную бутылку, в которой уже содержится около 10 стерильных стеклянных шариков

Асцитическая жидкость 250 °с.

2. Взвесьте

Олеиновая кислота 25 грамм

и добавьте его к асцитной жидкости во флаконе.

3. Равномерно распределите эмульсию путем встряхивания (вручную или в машине для встряхивания) в течение десяти минут.

4. Разжижите и отмерьте в колбу

Питательный агар 750 °с

затем охладите до 55°C.

5. Смешайте эмульсию олеиновой кислоты с агаром.

6. Добавьте 1%-ный стерильный нейтральный красный раствор при температуре 10°C. водный раствор.

7. Разлейте по трубкам в количестве 10 гр., наклоните и дайте застыть.

8. Инкубируйте в течение сорока восьми часов при температуре 37 ° C. Все загрязненные пробирки отбраковывайте. Храните стерильные пробирки для дальнейшего использования.

Группа кишечных палочек и брюшного тифа.

Бульон Париетти.—

1. Отмерьте чистую соляную кислоту (4°с) и добавьте к ней 5-процентный раствор карболовой кислоты (100°с). Перед использованием дайте раствору настояться не менее нескольких дней.

2. Этот раствор добавляют в количествах 0,1, 0,2 и 0,3 стакана (подают с помощью стерильной градуированной пипетки) в пробирки, каждая из которых содержит по 10 стаканов предварительно стерилизованного питательного бульона (*видео*, стр. 163).

3. Выдержите при температуре 37 ° C в течение сорока восьми часов, чтобы удалить загрязненные пробирки. Остаток сохраните для использования в будущем.

Карболизированный бульон.—

1. Приготовьте питательный бульон (*смотрите* страницу 163, разделы 1-6). Отмерьте 1000 гр.

2. Взвесьте карболовую кислоту в количестве 1 грамма (для специальных целей может потребоваться 2,5 или 5 граммов) и растворите ее в среде.

3. Заверните в трубочку и стерилизуйте, как для бульона.

Карболизированный желатин.—

1. Приготовьте питательный желатин (*смотрите* стр. 164, разделы 1-7). Отмерьте 1000 гр.

2. Взвесьте 5 граммов карболовой кислоты (= 0,5%) и растворите ее в желатине.

3. При необходимости процедите через пюре-шарден.

4. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Один или 2,5 грамма карболовой кислоты (= 0,1% или 0,25%) иногда используются вместо 5 граммов для удовлетворения особых требований.

Карболизированный агар.—

1. Приготовьте питательный агар (*смотрите* страницу 167, разделы 1-8). Отмерьте 1000 гр.
2. Взвесьте 1 грамм чистого фенола и растворите в среде.
3. При необходимости процедите через пюре-шарден.
4. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Лакмусовая бумажка желатиновая.—

1. Приготовьте питательный желатин (*смотрите* страницу 164, разделы 1-8).
2. Добавьте стерильный раствор лакмусовой бумажки, достаточный для придания средству глубокого лавандового цвета.
3. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Лактозный лакмусовый бульон (Lakmus Molke).—

1. Взвесьте 4 грамма пептона и эмульгируйте его с мясным экстрактом при 200 °C (*видео*, стр. 148), предварительно нагретым до 60 °C.
2. Взвесьте 2 грамма соли и 20 граммов лактозы и смешайте с эмульсией.
3. Перелейте смесь в стерильную литровую колбу с мясным экстрактом на 200°C и добавьте дистиллированную воду на 600°C.
4. Нагревайте в пароварке при температуре 100 °C в течение тридцати минут, чтобы полностью растворился пептон и т.д.
5. *Тщательно нейтрализуйте на лакмусовой бумаге* путем последовательного добавления небольших количеств децинормального содового раствора.
6. Поставьте в пароварку на двадцать минут для выпадения фосфатов и т.д.
7. Отфильтруйте через шведскую фильтровальную бумагу двух толщин.
8. Добавьте стерильный раствор лакмусовой бумажки, достаточный для окрашивания среды в темно-фиолетовый цвет.
9. Заверните в трубочку и стерилизуйте, как для бульона.

Лактозный лакмусовый желатин (Вюрц).—

1. Приготовьте питательный желатин (*смотрите* страницу 164, разделы 1-4).
2. Доведите реакцию средней массы до -5.
3. Поставьте в пароварку при температуре 100 °C на двадцать минут.

4. Взбейте с яйцом, как для желатина.
5. Взвесьте 20 граммов лактозы (= 2%) и растворите ее в среде.
6. Процедите через пюре-шарден.
7. Добавьте достаточное количество стерильного раствора лакмусовой бумажки, чтобы средство приобрело бледно-лавандовый оттенок.
8. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Лактозный лакмусовый агар (Вюрц).—

1. Приготовьте питательный агар (*смотрите* страницу 167, разделы 1-4).
2. Доведите реакцию средней массы до -5.
3. Поставьте в пароварку при температуре 100 ° C на двадцать минут.
4. Остудите до 60 °C и смешайте с яйцом, как для приготовления питательного агара.
5. Взвесьте 20 граммов лактозы (= 2%) и растворите ее в среде.
6. Процедите через папье-шарден, используя воронку для горячей воды.
7. Добавьте стерильный раствор лакмусовой бумажки, достаточный для окрашивания среды в бледно-лавандовый цвет.
8. Пробирку стерилизуйте, как для питательного агара.

Картофельный бульон с глицерином.—

1. Возьмите 1 кг картофеля, тщательно вымойте в воде, очистите и мелко натрите на хлебной терке.
2. Взвесьте картофельную терку, поместите ее в 2-литровую колбу, и добавьте дистиллированную воду в пропорции 1 ст.л. на каждый грамм веса картофеля. Дайте колбе постоять в холодильнике в течение двенадцати часов.
3. Процедите смесь через масляный муслин и отфильтруйте через шведскую фильтровальную бумагу в градуированный цилиндр. Обратите внимание на количество фильтрата.
4. Поместите фильтрат в колбу, добавьте равное количество дистиллированной воды и нагревайте в паровом стерилизаторе в течение шестидесяти минут.
5. Добавьте 4%-ный глицерин, тщательно перемешайте и снова процедите.
6. Разлейте по трубочкам и стерилизуйте, как для питательного бульона.

Картофельный желатин (Эльснер).—

1. Возьмите 1 кг картофеля, тщательно промойте в воде, очистите и, наконец, мелко натрите на хлебной терке.

2. Взвесьте картофельную терку, поместите ее в 2-литровую колбу и добавьте дистиллированную воду в пропорции 1 ст.л. на каждый грамм веса картофеля. Дайте колбе постоять в холодильнике в течение двенадцати часов.
3. Процедите смесь через масляный муслин и отфильтруйте через шведскую фильтровальную бумагу в мерный цилиндр.
4. Добавьте 15%. В картофельный отвар добавьте желатин и выпаривайте смесь под давлением в течение десяти минут.
5. Оцените реакцию; отрегулируйте реакцию средней массы до +25.
6. Остудите среду до температуры ниже 60°C.; взбейте с яйцом, как для получения питательного желатина (*видео*, стр. 166).
7. Добавьте 1%. йодид калия (порошкообразный) в среду.
8. Процедите через пюре-шарден.
9. Разлейте по трубочкам и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Эскулиновый агар.—(*B. coli* и родственные организмы дают черные колонии, окруженные черным ореолом.)

1. Отмерьте 400°с дистиллированной воды в тарированную 2-литровую колбу.

2. Взвесьте

Агар	15 граммов
Пептона	10 граммов
таурохолата натрия	5 граммов

и размешайте в густую пасту с 150 г дистиллированной воды.

3. Добавьте эту пасту в дистиллированную воду в колбе.
4. Растворите ингредиенты, пропуская через смесь горячий пар.

5. Взвесьте

Эскулин	1,0 грамм
цитрата железа	0,5 грамма

и растворите во второй колбе, содержащей 100%-ную дистиллированную воду.

6. Смешайте содержимое двух колб — доведите вес до расчетного среднего значения (в данном случае 1031,5 грамма) путем добавления дистиллированной воды при температуре 100°C.
7. Взбейте яйцом и процедите.
8. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Желчно—солевой агар (Макконки).-

1. Взвесьте 15 граммов порошкообразного агара (= 1,5%) и разведите в эмульсии с 200 градусами *холодной воды из-под крана*.
 2. Взвесьте 20 граммов пептона (= 2%) и сделайте эмульсию при 200 °С. *водопроводная вода* предварительно подогрета до 60°С.
 3. Тщательно перемешайте пептоновую и агаровую эмульсии.
 4. Взвесьте 5 граммов таурохолата натрия (= 0,5%), растворите его в 300-градусной *водопроводной* воде и используйте раствор для промывки агаро-пептоновой эмульсии в тарированной 2-литровой колбе.
 5. Пропускайте горячий пар через смесь в течение двадцати минут.
 6. Доведите вес средней массы до расчетного значения для одного литра (1040 граммов).
 7. Охладите до 60°С и смешайте с яйцом, как для приготовления питательного агара (*видео*, стр. 168).
 8. Процедите через папье-шарден, используя воронку для горячей воды.
 9. Взвесьте 10 граммов лактозы (= 1%) и растворите ее в агаре.
- При желании добавьте 5 ст.л. 1%-ного водного раствора нейтрального красного цвета. (= 0,5%).
10. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Лакмусово-нутрозовый агар (Дригальски—Конради).-

Эту среду следует готовить точно таким же образом, как и нутрозный агар, описанный на стр. 172, заменив водную сыворотку мясным экстрактом и увеличив процентное содержание добавляемого агара на литр до 3%.

Фуксиновый агар (Браун).—

1. Разжижите и отмерьте в стерильную колбу:

Питательный агар 1000 °с

2. Взвесьте: 10 граммов лактозы и растворите в жидком агаре.
3. Отрегулируйте реакцию на -5 и отфильтруйте.
4. Отмерьте и тщательно перемешайте с агаром:

Фуксин, спиртовой раствор 5 °с

Раствор фуксина готовят путем смешивания:

Фуксин (основной) 3 грамма.

Абсолютный алкоголь 60 °с

Дайте настояться двадцать четыре часа, затем тщательно отцентрифугируйте и перелейте надосадочную жидкость в бутылку с хорошо закупоренной пробкой.

5. Отмерьте и добавьте в питательный агар 10%-ный сульфит натрия. свежеприготовленный водный раствор при температуре 25°с.

6. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

7. Храните в темном шкафу.

Фуксин—сульфитный агар (Эндо).-

1. Разжижите и отмерьте в стерильную колбу:

Питательный агар 1000 °с

2. Взвесьте

Лактоза 10 грамм.

и растворите в жидком агаре.

3. Отрегулируйте реакцию на +3 и отфильтруйте.

4. Отмерьте и тщательно перемешайте с жидким агаром.

Фуксин, спиртовой раствор (см. выше) при 5°с.

5. Отмерьте и добавьте в среду

Сульфит натрия, 10%. водный раствор 25°с

6. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Агар бриллиантово—зеленый (Конради).-

1. Разжижите и отмерьте в стерильную колбу

Питательный агар 1000 °с

2. Доведите реакцию до +30, добавив обычную фосфорную кислоту; и отфильтруйте.

3. Отмерьте и тщательно перемешайте с жидкой средой

Бриллиантовый зеленый (Hoechst) 1 на тысячу водный раствор 6,5 °с

4. Отмерьте и добавьте в среду

Пикриновая кислота (Грублер), 1%. водный раствор 6,5°с

5. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Агар с блестящей зеленой желчной солью (Fawcus).—

1. Взвесьте 20 граммов агара и разведите в 100 г холодной дистиллированной воды.
2. Перелейте эмульсию в "тарированную" 2-литровую колбу с 500-градусной дистиллированной водой.
3. Растворите агар, пропуская через колбу горячий пар.
4. Остудите, взбейте с яйцом и процедите.

5. Взвесьте

Таурохолат натрия 5 грамм

Пептон 20 грамм

и добавьте к среде в колбе.

6. Взвесьте

Лактоза 5 граммов

и добавьте к среде в колбе.

7. Отрегулируйте реакцию на +15 и при необходимости отфильтруйте.

8. Отмерьте

Бриллиантовый зеленый, 1 на тысячу водный раствор при 20 °с

и тщательно перемешайте с жидким агаром.

9. Отмерьте и добавьте в среду

Пикриновая кислота, 1%. водный раствор при 20°с

10. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Китайский зеленый агар (Вербицкий).—

1. Разжижите и отмерьте в стерильную колбу

Питательный агар 1000 °с

2. Точно отрегулируйте реакцию до +13 и отфильтруйте.

3. Отмерьте и тщательно перемешайте с жидким агаром

Чайна грин 0,2%. водный раствор при 15°с

4. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Малахитово—зеленый агар (Леффлер).-

1. Разжижите и отмерьте в стерильную колбу

Питательный агар 1000 °с

2. Взвесьте

Декстроза 10 грамм.

и растворите в питательном агаре.

3. Отрегулируйте реакцию на +3 и отфильтруйте.

4. Отмерьте и тщательно перемешайте жидкий агар

Малахитово-зеленый, 0,1%. водный раствор 16°с.

для "**слабой**" среды.

4а. К отфильтрованному агару добавить

Малахитово-зеленый, 2%. водный раствор при 25°с.

для "**сильной**" среды.

5. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Агар с двойным сахаром (Рассел).—

1. Разжижите и отмерьте в стерильную колбу

Питательный агар 1000 °с

2. Добавьте 100%-ный раствор лакмусовой бумажки к жидкому агару.

3. Взвесьте и растворите в жидком агаре.

Лактоза 10 грамм

Декстроза 10 грамм.

4. Сделайте реакцию среды нейтральной по отношению к лакмусовой бумаге, осторожно добавив обычную едкую соду.

5. Разлейте по 10 стаканам и стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С в течение двадцати минут каждый из трех последующих дней.

6. Храните для использования в прохладном темном месте.

B. Diphtheriae.

Глицериновая сыворотка крови.-

1. Приготовьте сыворотку крови, как описано на стр. 168, разделы 1-4.

2. Добавьте 5%. чистый глицерин.

3. Выполните то, что описано выше для обычной сыворотки крови, разделы 5-7.

Примечание.—Разное процентное содержание глицерина — от 4%. до 8%. —используется для специальных целей. Обычно используется пять процентов. .

Сыворотка крови (по Леффлеру).-

1. Приготовьте питательный бульон (*видео*, стр. 163), используя мясной экстракт, приготовленный из телятины, а не из говядины.
2. Добавьте в бульон 1%. глюкозы и дайте ей полностью раствориться.
3. Теперь добавьте 300 г чистой сыворотки крови (*смотрите* стр. 168, разделы 1-4) на каждые 100 г этого бульона.
4. Разлейте по стерильным пробиркам и заполните, как для обычной сыворотки крови.

Сыворотка крови (Лоррейн Смит).-

1. Соберите сыворотку крови (*видео*, стр. 168, разделы 1-4), по возможности свободную от гемоглобина.
2. Взвесьте 0,15%. гидратируйте натрий и растворите его в жидкости (или добавьте 0,375 стакана деканормального содового раствора на каждые 100 стаканов сыворотки).
3. Наберите в трубку и застудите при температуре 100 ° C в распылителе сыворотки.
4. Выдержите при температуре 37 ° C в течение сорока восьми часов, чтобы удалить все загрязненные пробирки. Остаток сохраните для использования в будущем.

Сыворотка крови (член совета и Мэллори).—

1. Соберите сыворотку крови на бойне, коагулируйте, удалите сыворотку и пробирку (*видео*, стр. 168).

Необходимо соблюдать большую осторожность, чтобы не допустить попадания пузырьков воздуха — действительно, если за один раз заполняется всего несколько пробирок, рекомендуется установить их вертикально в ресивере воздушного насоса и как можно полнее осушить перед тем, как поместить в устройство для впрыскивания сыворотки.

2. Нагрейте пробирки в наклонном положении в стерилизаторе с горячим воздухом при температуре 90 ° C. до образования плотной коагуляции, скажем, в течение получаса.
3. Стерилизуйте в паровом стерилизаторе при температуре 100 ° C по 20 минут каждый из трех последующих дней.

Полученная среда не полупрозрачная, а непрозрачная и плотная.

Б. Туберкулез.

Яйцо среднее (Любенау).—

Некоторые предпочитают эту модификацию яичной среды Dorset (*смотрите видео* на странице 174) для роста туберкулезной палочки человеческого типа. Он заключается в

добавлении одной части 6%. глицерина в обычном физиологическом растворе в яичную смесь между этапами 4 и 5.

Глицериновый бульон.—

1. Отмерьте питательный бульон на 1000 гр. (*видео на странице 163, разделы 1-6*).
2. Отмерьте 60 г глицерина (= 6%) и добавьте в бульон.
3. Заверните в трубочку и стерилизуйте, как для бульона.

Глицериновый агар.—

1. Приготовьте питательный агар (*смотрите страницу 167, разделы 1-8*). Отмерьте 1000 гр.
2. Отмерьте чистый глицерин, доведите до 60°с (= 6%) и добавьте в агар.
3. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Глицериновая сыворотка крови.-

1. Приготовьте сыворотку крови, как описано на стр. 168, разделы 1-4.
2. Добавьте 5%. чистый глицерин.
3. Выполните то, что описано выше для обычной сыворотки крови, разделы 5-7.

Примечание.—Разное процентное содержание глицерина — от 4%. до 8%. —используется для специальных целей. Обычно используется пять процентов. .

Картофель с глицерином.—

1. Приготовьте обычные картофельные дольки (*смотрите стр. 174, разделы 1-4*).
2. Замочите дольки в 25-процентном. растворе глицерина на пятнадцать минут.
3. Смочите ватные подушечки на дне картофельных трубочек 25-процентным раствором. глицерина.
4. Вставьте по дольке картофеля в каждую пробирку и снова установите пробирки на место.
5. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С. в течение двадцати минут каждый из *пяти* дней подряд.

Носитель из тканей животного происхождения (Frugoni).—

1. Возьмите несколько стерильных пробирок размером 16 × 3 или 4 см, закупорьте их ватой и вставьте в каждую прочную стеклянную трубку длиной 2 см (диаметром около 1 см); залейте глицериновым (6%) бульоном до верхнего уровня стеклянной трубки. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С. в течение двадцати минут каждый из трех последующих дней.
2. Убейте маленького кролика с помощью паров хлороформа.

3. Соблюдая строгие меры предосторожности, извлеките легкие, печень и другие твердые органы и переложите их в стерильную посуду из двойного стекла.
4. С помощью стерильных ножниц и щипцов разделите органы на примерно прямоугольные блоки размером 3 × 1,5 × 1 см.
5. Налейте в посуду достаточное количество стерильного раствора глицерина (6% в физиологическом растворе), накройте и дайте настояться в течение одного часа.
6. Вставьте кусочек ткани в каждую пробирку так, чтобы он опирался на верхний конец стеклянной трубки. (Теперь поверхность ткани будет оставаться влажной за счет притяжения капилляров и конденсации).
7. Стерилизуйте в автоклаве при температуре 120° С в течение тридцати минут.
8. Закройте пробирки крышками и храните их в холодильнике для дальнейшего использования.

Ткани, полученные при вскрытии, также можно использовать после предварительной стерилизации кипячением или автоклавированием.

Среды для исследования особых кокков.

Диплококк гонорейный *Æ*.

Асцитический бульон (сывороточный бульон).—

1. Соберите асцитическую жидкость (плевритную жидкость, жидкость при гидроцеле и т.д.) Путем аспирации непосредственно в стерильные колбы, соблюдая строго асептические меры предосторожности.
2. Смешайте сыворотку с удвоенным количеством стерильного питательного бульона (*видео*, стр. 163).
3. При необходимости (из-за наличия крови, кристаллов и т.д.) процедите бульонную сыворотку через фарфоровый фильтр-свечу.
4. Пробуйте и стерилизуйте на водяной бане при температуре 56 ° С в течение получаса каждый из пяти дней подряд.
5. Выдержите при температуре 37 ° С в течение сорока восьми часов и удалите загрязненные пробирки. Оставшееся храните для использования в будущем.

Сывороточный агар (Хейман).—

1. Приготовьте питательный агар (*видео*, стр. 167) по следующей формуле:

Агар	2,0%.
Пептон	1,5%.
Соль	0,5%.
Мясного экстракта	<i>достаточно.</i>

2. Произведите реакцию среды + 10.
3. Фильтр; пробирка в количестве 6 гр.
4. Стерилизуйте, как для питательного агара.
5. После третьей стерилизации охладите пробирки до 42 ° С и добавьте в каждую по 3 стакана стерильной жидкости при гидроцеле, асцитической жидкости или плевритном выпоте (предварительно стерилизованные, при необходимости, фракционным методом); дайте пробиркам застыть в наклонном положении.
6. После затвердевания выдержите при 37 ° С в течение сорока восьми часов, а все загрязненные пробирки удалите. Оставшееся сохраните для использования в будущем.

Сывороточный агар (Вертгеймера).—

1. Приготовьте питательный агар (*смотрите* страницу 167) по следующей формуле:

Агар 2,0%.

Пептон 2,0%.

Соль 0,5%.

Мясного экстракта *достаточно.*

2. Произведите реакцию среды +10.
3. Фильтр; пробирка в количестве 5 гр.
4. Стерилизуйте, как для питательного агара.
5. После последней стерилизации охладите до 42 ° С, затем добавьте 5 °с стерильной сыворотки крови из плаценты человека (стерилизованной, при необходимости, дробным методом) в каждую пробирку; пробирки наклоните.
6. После затвердевания выдержите при 37 ° С в течение сорока восьми часов, а все загрязненные пробирки удалите. Оставшееся сохраните для использования в будущем.

Сывороточный агар (Кантак и Стивенс).—

1. Соберите асцитическую, плевритную или гидроцеле жидкость в стерильные колбы и оставьте в холодильнике на двенадцать часов для отстаивания.
2. Перелейте 1000 мл прозрачной жидкости в мерный цилиндр и перелейте в стерильную литровую колбу.
3. Добавьте 0,5 стакана деканормального раствора NaOH на каждые 100 стаканов сыворотки (*т.е.* 5,0 стакана) и тщательно перемешайте.
4. Прогревайте в пароварке в течение двадцати минут.
5. Взвесьте 15 граммов агара, эмульгируйте в отдельной емкости с 200 г щелочной жидкости, предварительно охлажденной примерно до 20°С, а затем добавьте к остальной жидкости в колбе.

6. Пропускайте горячий пар через смесь в течение двадцати минут, чтобы агар растворился.
7. Процедите через папье-шарден, используя воронку для горячей воды.
8. Взвесьте 10 граммов глюкозы (= 1%) и растворите ее в прозрачном агаре.
- 8а. При желании добавьте 5%-ный глицерин в прозрачный агар.
9. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Сывороточный агар (Либмана).—

1. Приготовьте питательный агар (*видео*, стр. 167), используя, однако, 1,5% пептон (то есть 15 граммов на литр вместо 10 граммов).
2. Установите реакцию на 0 (*т.е.* нейтральную по отношению к фенолфталеину).
3. Отфильтруйте и перелейте сжиженную среду при температуре 100°С в стерильную колбу.
4. Взвесьте 20 граммов декстрозы и растворите в жидком агаре.
5. Расфасуйте по 6 стаканам и стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С в течение тридцати минут каждый из трех дней подряд.
6. После третьей стерилизации охладите до 42 ° С и добавьте в каждую пробирку по 3 стакана стерильной жидкости при гидроцеле, асцитической жидкости или плевритном выпоте (предварительно стерилизованных, при необходимости, фракционным методом); дайте пробиркам застыть в наклонном положении.
7. После затвердевания выдержите при 37 ° С в течение сорока восьми часов, а все загрязненные пробирки удалите. Оставшееся сохраните для использования в будущем.

Яичный белок, уплотненный.-

1. Разбейте несколько свежих яиц (куриных, утиных или индюшачьих) и соберите "белки" в мерный цилиндр, стараясь не смешивать с желтками.
2. Добавьте 40% дистиллированной воды и тщательно взбейте смесь с помощью яичного венчика.
3. Взвесьте 0,15% гидрат натрия и растворите его в жидкости (или добавьте количество деканормального раствора каустической соды, рассчитанное для получения требуемого процентного содержания соды в общем объеме жидкости —*т.е.* 0,375 ч.л. деканормального раствора NaOH на 100 ч.л. смеси).
- 3а. Глюкозы в количестве 1-2%. теперь при желании можно добавить.
4. Процедите смесь через масляный муслин и процедите через фарфоровую фильтровальную свечу в стерильную фильтровальную колбу.
5. Наберите в пробирку и застудите при 100 ° С в распылителе сыворотки.
6. Выдержите при температуре 37 ° С в течение сорока восьми часов и удалите все загрязненные пробирки; остальное сохраните для использования в будущем.

Яичный белок (Tarchanoff и Kolesnikoff).-

1. Поместите целые куриные яйца в деканонизированный раствор каустической соды на десять дней. (По истечении этого времени белок становится твердым, как желатин.)
2. Аккуратно удалите скорлупу и нарежьте яйцо мелкими ломтиками.
3. Мойте в течение двух часов в проточной воде.
4. Положите ломтики яиц в большой стакан и стерилизуйте в пароварке при температуре 100 ° С в течение одного часа.
5. Перенесите каждый ломтик яйца с помощью пары стерилизованных щипцов в чашку Петри или большую капсулу.
6. Стерилизуйте в пароварке при температуре 100° С. в течение двадцати минут каждый из трех дней подряд.

Бульон с яичным альбумином (Липшуэц).—

1. Взвесьте

Яичный альбумин (особо мелкий порошок, Merck). 4 грамма

и поместите в 2-литровую колбу с несколькими стерильными стеклянными шариками.

2. Отмерьте дистиллированную воду 200°с в полулитровую колбу и нагрейте в инкубаторе до 37 °С.
3. Добавьте воду в колбу с альбумином и шариками и растворите, встряхивая.
4. Добавьте n/10-NaOH при 40 °с. Дайте смеси настояться в течение тридцати минут при частом встряхивании.
5. Процедите через шведскую фильтровальную бумагу.
6. Стерилизуйте кипячением два или три раза с интервалом в два часа.
7. Добавьте обычный питательный бульон при температуре 600°с.
8. Разлейте по небольшим колбам Эрленмейера в количестве 50 гр.
9. Инкубируйте в течение сорока восьми часов при температуре 37 ° С.-выбросьте все загрязненные колбы и сохраните остатки для использования в будущем.

Агар с яичным альбумином.—

1. Приготовьте раствор яичного альбумина, как описано выше 1-6.
2. Разжижите и отмерьте обычный питательный агар при температуре 600°с и добавьте в раствор яичного альбумина (вместо питательного бульона).
3. Выполните указанные выше действия 8-9.

Внутриклеточный менингитический диплококк.

Асцитный жидкий агар (Вассерман) *Синоним N-as-gar (Мервин Гордон).*

1. Разжижите и отмерьте в стерильную колбу:

Питательный агар 600 °с

2. Отмерьте в полулитровую колбу

Дистиллированная вода 210 °с

и добавить к нему

Асцитическая жидкость 90 °с.

Нутроза 6 грамм

3. Нагревайте на огне бунзена, постоянно встряхивая, пока жидкость не закипит, а нутроза не растворится.

4. Добавьте асцитический раствор нутрозы к жидкому агару.

5. Нагревайте в пароварке в течение тридцати минут, затем процедите.

6. Пробирку простерилизуйте, как для питательного агара.

Примечание.—Объем готовой среды в данном случае составляет 900 гр.с., только из-за того, что при приготовлении будут использованы неудобные фракции объемом ровно до одного литра.

Диплококк пневмоний.

Кровяной агар (промывочный).—

1. Растопите несколько тюбиков с питательным агаром (*видео*, стр. 167) и дайте им застыть в наклонном положении.

2. Поместите пробирки в горизонтальном положении в "горячий" инкубатор на сорок восемь часов, чтобы выпарилась часть конденсата.

3. Убейте маленького кролика хлороформом и распилите его на доске (как для вскрытия). Тщательно смочите шерсть 2-процентным раствором. раствор лизола.

4. Стерилизуйте несколько пар щипцов, ножниц и т.д. кипячением.

5. Отрастите кожу на грудной клетке стерильными инструментами.

6. Вскройте грудную полость с помощью нового набора стерильных инструментов.

7. Вскройте перикард другим набором стерильных инструментов.

8. Прижгите поверхность левого желудочка раскаленным железом и удалите жидкую кровь из сердца с помощью стерильных пипеток (*например,, показанных на рис. 13, с*).

9. Нанесите небольшое количество крови на наклонную поверхность агара в каждой из пробирок и дайте ей растечься по всей поверхности среды.

10. Установите пробирки в наклонное положение и дайте крови свернуться.

11. Верните "кровяной агар" в горячий инкубатор на сорок восемь часов и удалите все загрязненные пробирки. Остаток сохраните для использования в будущем.

Среда для исследования бактерий полости рта в целом.

Картофельный желатин (с начинкой).—

1. Приготовьте картофельный бульон с глицерином (см. стр. 203, разделы 1-5).

2. Добавьте 10% желатин в картофельный отвар и выпаривайте смесь под давлением в течение десяти минут.

3. Оцените реакцию; отрегулируйте реакцию среды до +5.

4. Остудите среду до температуры ниже 60 ° C. Взбейте с яйцом, как для получения питательного желатина.

5. Процедите через пюре-шарден.

6. Сложите в трубочку и стерилизуйте, как для приготовления питательного желатина.

Среда для изучения простейших.

Тканевая среда (Ногучи).—Для спирохет (растения должны выращиваться анаэробно).

1. Закупорьте и простерилизуйте пробирки размером 20 × 2 см.

2. Убейте маленького кролика парами хлороформа. Вскройте брюшную полость со всеми мерами асептики, удалите почки и яички и переложите в стерильную стеклянную посуду. Разрежьте органы стерильными ножницами на мелкие кусочки — скажем, кубиками по 4 миллиметра. Из четырех органов должно получиться от 25 до 30 кусочков ткани.

3. Положите небольшой кусочек стерильной ткани на дно каждого стерилизованного тюбика.

4. Возьмите колбу, содержащую около 400°с питательного агара (реакция+10), разжижите среду нагреванием и охладите на водяной бане до 50°С.

5. Добавьте 200 г асцитной жидкости или жидкости от гидроцеле (можно использовать лошадиную или овечью сыворотку, но она не так хороша) к жидкому агару и тщательно перемешайте, чтобы избежать образования пузырьков воздуха.

6. Налейте примерно по 20 г асцитного агара в каждую из стерилизованных пробирок, в которые уже вложен кусочек стерильной ткани кролика, поставьте все пробирки вертикально на подставки или в банку и дайте агару застыть.

7. После застывания налейте стерильное парафиновое масло на поверхность среды в каждом тюбике на глубину 3 сантиметра.
 8. Инкубируйте пробирки при 37°C в течение нескольких дней и выбросьте все, в которых обнаружится загрязнение.
 9. Храните такие пробирки стерильными для использования в будущем.
-

XIII. ИНКУБАТОРЫ.

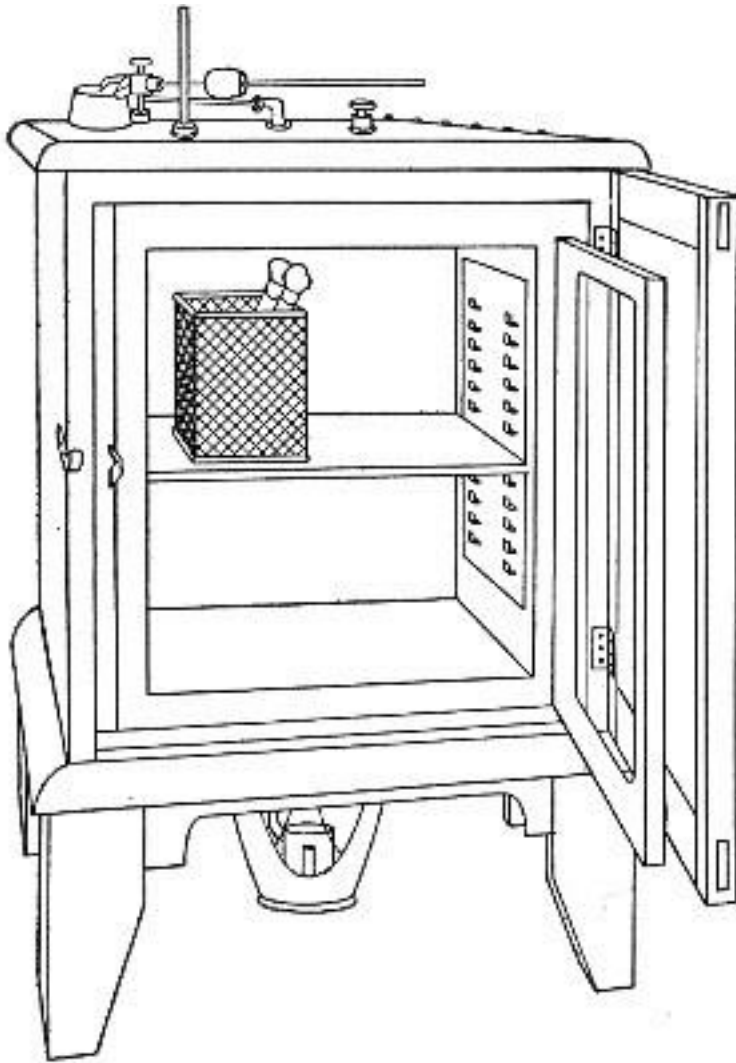


Рис. 113.—Инкубатор.

Инкубатор (рис. 113) состоит, по существу, из камеры для приема культур и т.д., окруженной водяной рубашкой, стенки которой сделаны из металла, обычно меди, а снаружи - из асбеста, войлока или деревянного кожуха. Вода в рубашке нагревается газом или электричеством и поддерживается при определенной постоянной температуре с помощью терморегулятора. Клеточный инкубатор (рис. 114), который был изготовлен для меня^[7] несколько лет назад, имеет наибольшую практическую пользу. Здесь центральная полость разделена пятью

перегородками с двойными стенками (в которых циркулирует вода в соединении с резервуарами для воды в верхней и нижней частях инкубатора) и снова железными полками, образующими двадцать четыре ячейки для голубей. В каждый из них вставляется железный ящик длиной 35 см × 12 см в ширину × 22 см в высоту, образующий автономный инкубатор. Выдвижной ящик оснащен деревянной формой, к которой прикреплена ручка и пронумерованная этикетка. Терморегулирующим устройством является хорошо известная капсула Hearson.

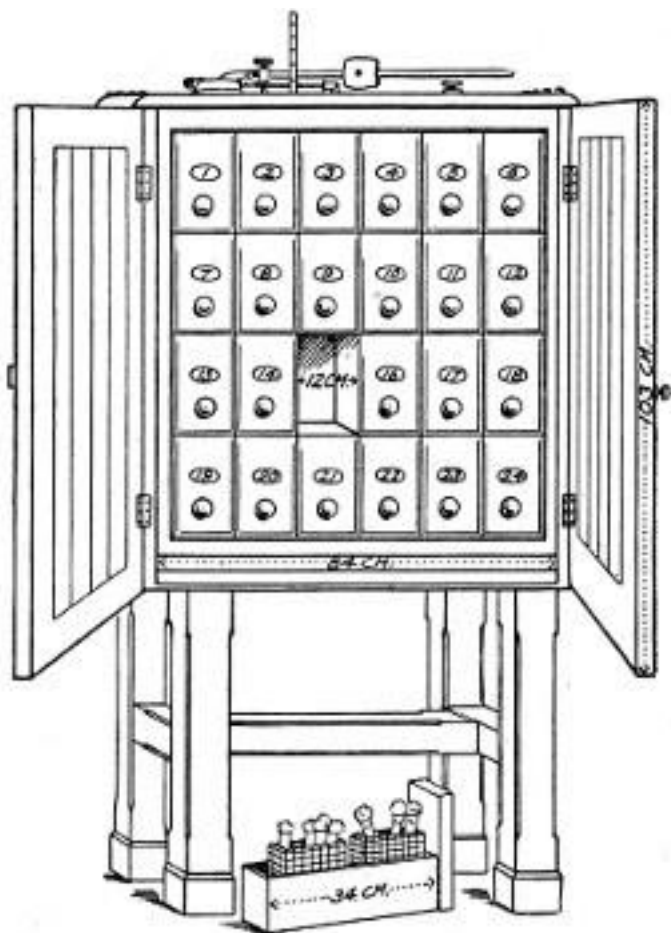


Рис. 114.Клеточный инкубатор.

Для культивирования бактерий в лаборатории требуется по крайней мере два инкубатора: один регулируется для поддержания температуры 37 ° С и известен как "горячий" инкубатор; другой - от 20 ° С до 22 ° С и известен как "холодный" инкубатор.

Два других инкубатора, температура которых регулируется до 42 ° С и 60 ° С. соответственно, хотя и не являются абсолютно необходимыми, очень скоро оправдывают их покупку.

Терморегуляторы.—Терморегулятор является наиболее важной частью инкубатора, поскольку от его эффективной работы зависит поддержание постоянной температуры в камере культивирования. Он также используется при приготовлении водных и парафиновых ванн и для многих других целей.

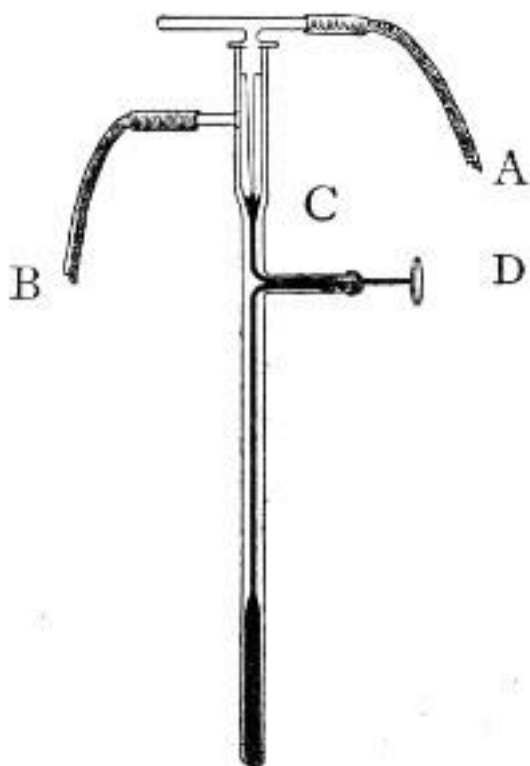


Рис. 115.Терморегулятор Райхерта.

Из множества форм и разновидностей терморегуляторов (кроме электрических) только два имеют достаточно общее применение, чтобы нуждаться в упоминании. В одном из них подача газа к газовой форсунке регулируется расширением или сжатием ртути внутри стеклянной колбы; в другом - изменением положения стенок металлической капсулы, содержащей жидкость, точка кипения которой соответствует температуре, при которой должен работать инкубатор. Это:

(a) *Reichert's* (рис. 115) состоит из колбы, содержащей ртуть, которая должна быть взвешена в среде, будь то воздух или вода, температуру которых желательно регулировать. Газ поступает в точку A и выходит в форсунку через точку B. При повышении температуры ртуть расширяется и перекрывает основную подачу газа. При понижении температуры ртуть сжимается и снова открывает узкую трубку C. С помощью винта с накатанной головкой D (который механически поднимает или опускает столбик ртути независимо от температуры) и с помощью термометра устройство можно настроить на поддержание в инкубаторе любой желаемой температуры. При такой форме требуется специальная газовая горелка с отдельной подачей газа к контрольному жиклеру сбоку.

(b) *Капсульный регулятор Hearson* состоит из герметично закрытой металлической капсулы, заполненной жидкостью, которая кипит при требуемой температуре, которая регулируется внутри инкубатора. К верхней стороне капсулы припаян толстый кусок металла, имеющий центральную чашку для размещения нижнего конца жесткого стержня, через который движения стенок капсулы передаются на газовый клапан, закрепленный снаружи инкубатора.

Газовый клапан или регулятор показан на рисунке 116. A - вход для газа, C - выход для горелки, нагревающей водяную рубашку, B D - рычаг, поворачиваемый в соответствии со стандартами в

точке G и приводимый в действие капсулой через жесткий стержень, который входит в гнездо под винтом P.

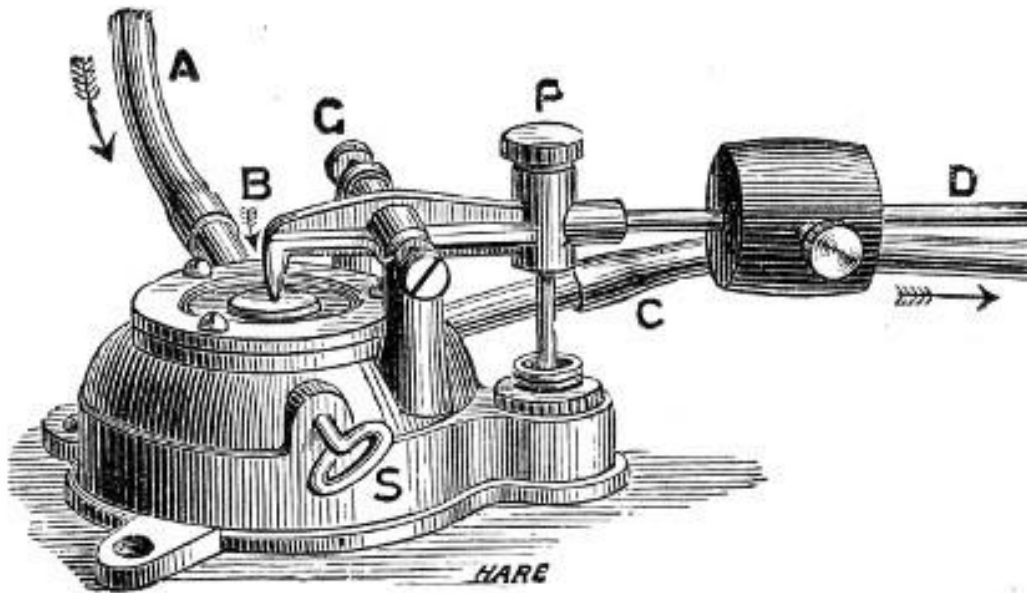


Рис.

116. Капсульный терморегулятор.

Конструкция клапана такова, что всякий раз, когда короткое плечо рычага Bd нажимает на диск ниже конца B, основная подача газа полностью прекращается. Однако в такие моменты очень небольшая порция газа проходит от A к C через отверстие внутри клапана, размер которого можно регулировать с помощью винтовой иглы S, следовательно, газовое пламя под инкубатором никогда не гаснет.

Расширение металлических стенок капсулы, которое происходит при кипячении ее содержимого, обеспечивает движущую силу, передаваемую через жесткий стержень для подъема длинного плеча рычага Bd, и поскольку это расширение происходит только при заданной температуре, на рычаг будут воздействовать только при достижении критической температуры, при этом никакого ощутимого эффекта не будет произведено даже при 1 ° C ниже той, при которой капсуле предназначено действовать.

W представляет собой груз, скользящий по стержню рычага D; за счет увеличения расстояния между грузом и точкой опоры нижнего увеличивается давление на стенки капсулы, в результате чего температура кипения жидкости в капсуле немного повышается, и, таким образом, для любой конкретной капсулы может быть получен диапазон примерно в два градуса.

СНОСКИ:

[7] Изготовлено фирмой Chas. Hearson & Co., 235 Regent St., Лондон, W.

XIV. СПОСОБЫ ВЫРАЩИВАНИЯ.

Культивирование микроорганизмов обычно производится в лаборатории одним из трех способов:

Культуры из пробирок.

Культуры из пластинок.

Висячие культуры.

Их можно инкубировать либо **аэробно** (*т.е.* в присутствии кислорода), либо **анаэробно** (*т.е.* в отсутствие кислорода или в присутствии индифферентного газа, такого как водород, азот или диоксид углерода).

Что касается температуры, при которой выращивают культуры, то в качестве общего правила можно указать, что все среды, ставшие твердыми в результате добавления желатина, инкубируют при 20°C или, во всяком случае, при температуре, не превышающей 22°C (то есть в "холодном" инкубаторе); в то время как жидкие среды и все другие твердые среды инкубируют при 37°C (то есть в "горячем" инкубаторе). Исключений из этого правила множество. Например, при изучении роста психрофильных бактерий, дрожжей и плесневых грибов для всех сред используется холодный инкубатор.

Выращенные в пробирках растения обычно упаковывают в инкубаторе в небольшие жестяные цилиндры, подобные тем, в которых продаются американские сигареты, или в квадратные жестяные коробки. Для той же цели можно использовать мензурки или стаканы, но они не так удобны, поскольку являются хрупкими. Металлические стойки для пробирок, достаточно длинные, чтобы просто поместиться внутри инкубатора, и каждая вмещает два ряда пробирок, также чрезвычайно полезны.

АЭРОБНЫЙ.

Подготовка трубчатых культур.

Подготовка к выращиванию в пробирке заключается в:

(a) Инокулирование пробирки со стерильной питательной средой частью исследуемого материала.

(b) Инкубирование инокулированной пробирки при подходящей температуре.

Детали первого из этих процессов должны несколько различаться в зависимости от того, инокулированы ли пробирки с питательными средами или "посажены" из...

1. Ранее существовавшие культуры.
2. Ранее собранный патологический материал (*видео*, стр. 373).
3. Жидкости, ткани и т.д. Или непосредственно из организма животного.

Способ получения трубчатых сортов из ранее существовавших сортов заключается в следующем:

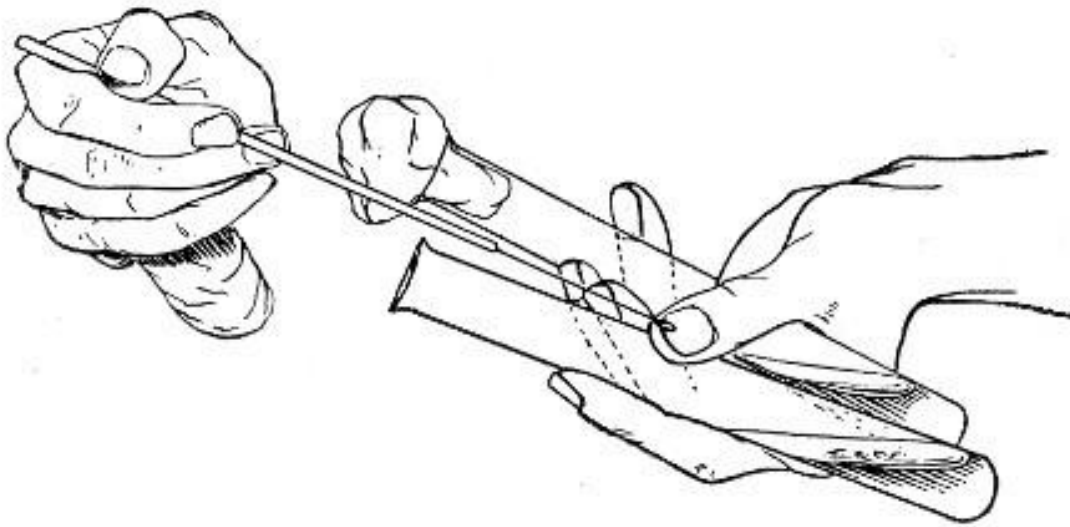


Рис. 117.

Пробирки для инокуляции, если смотреть спереди.

1. Жидкая среда (например, питательный бульон).—

1. Подожгите ватную пробку пробирки с культивированием, а также пробирки со стерильным бульоном.
2. Держите две трубки бок о бок между большим пальцем левой руки, указательным и безымянными пальцами так, чтобы запечатанные концы упирались в тыльную сторону кисти, и разделите горловины трубок (которые направлены вправо) кончиком второго пальца. Держите пробирки как можно ближе к горизонтали, не допуская попадания жидкости из бульонной пробирки на ватную пробку (рис. 117).
3. Простерилизуйте платиновую петлю и дайте ей остыть.[\[8\]](#)
4. Зажмите пробку тюбика с культивированием между мизинцем и ладонью и извлеките ее из тюбика.
5. Зажмите пробку бульонного тюбика между безымянным и подушечкой большого пальцев и извлеките ее из тюбика.
6. Вставьте платиновую петлю в пробирку с культурой — не допускайте, чтобы петля касалась стенок пробирки или ручка касалась среды — и удалите небольшую часть наростов; извлеките петлю из пробирки, направляя инфицированную сторону петли вниз.
7. Проденьте петлю в бульонную пробирку почти до уровня жидкости, переверните петлю так, чтобы зараженная сторона была обращена вверх, эмульгируйте часть наростов во влаге, прилипшей к стороне пробирки, которая находится самой верхней. Снимите петлю.
8. Снова вставьте обе трубки в розетку.
9. Простерилизуйте платиновую петлю.
10. На этикетке бульонного тюбика нанесите (а) название организма и (b) дату прививки.
11. Инкубировать.

2. Твердые носители.—Твердые носители хранятся в пробирках одним из двух способов:

1. Наклонная трубка (рис. 118), в которой среде давали затвердеть, пока трубку удерживали в наклонном положении, образуя таким образом обширную поверхность среды, простирающуюся от дна трубки почти до ее горловины.

Это используется для культивирования "полосами" или "мазками" (*Strichcultur*).

2. Прямая трубка (рис. 119), в которой среда образует цилиндрическую массу в нижней части трубки и представляет собой верхнюю поверхность, расположенную под прямым углом к длинной оси трубки.

Это используется для культивирования "колотьем" или "палочкой" (*Stichcultur*), или путем инокуляции среды в жидком состоянии и выдерживания в таком положении для культивирования "встряхиванием".

Культура с прожилками.—

1. Разожгите пробки, простерилизуйте платиновую петлю (или лопаточку). Откройте пробирки и зарядите петлю, как при предыдущей прививке.

2. Подведите инфицированную петлю ко дну инокулируемой пробирки и проведите ею как можно более легко по центру поверхности среды, завершая "полоску" на тонком слое среды возле устья пробирки.

3. Установите пробирки на место, простерилизуйте платиновую петлю.

4. Наклейте этикетку на пробирку с инокуляцией и инкубируйте.

Мазок культуры.— Действуйте в основном так же, как при посеве полос, но разотрите инфицированную петлю по всей поверхности среды, вместо того чтобы ограничивать посев узкой линией.

Примечание.—Перед использованием наклонные трубочки с желатином и агаром следует "раскатать".

Культура от ножевых ранений.—

1. Подожгите пробки, откройте пробирки, простерилизуйте платиновую иглу и зарядите ее инокулятом, как при предыдущих культивированиях.

2. Вставьте платиновую иглу в пробирку для инокуляции до тех пор, пока она не коснется центра поверхности среды. Теперь глубоко воткните ее в вещество среды, удерживая иглу как можно ближе к оси цилиндра со средой. Затем извлеките иглу.

3. Установите пробирки на место. Простерилизуйте платиновую иглу.

4. Наклейте этикетку на только что посаженную пробирку и инкубируйте.

Примечание.—При хранении желатина в течение некоторого времени верхняя поверхность цилиндра становится вогнутой из-за испарения. Пробирки, имеющие такой внешний вид, следует разжижить и снова дать им отстояться перед использованием для колотых культур, в

противном случае, когда игла войдет в среду, поверхностное натяжение приведет к расщеплению желатинового цилиндра.

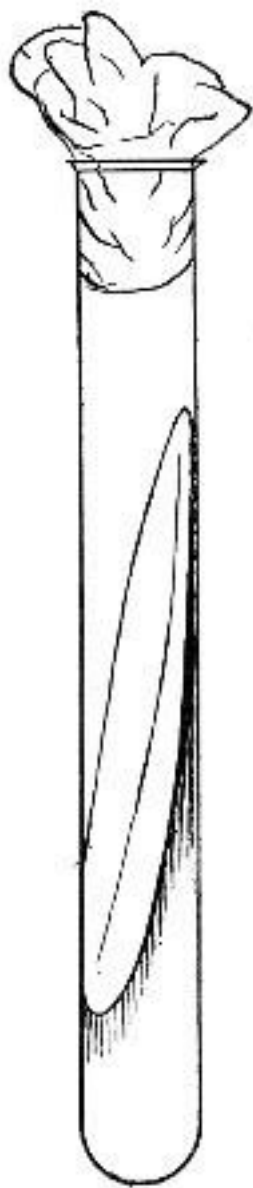


Рис. 118. Наклонная среда для посева полос или мазков.

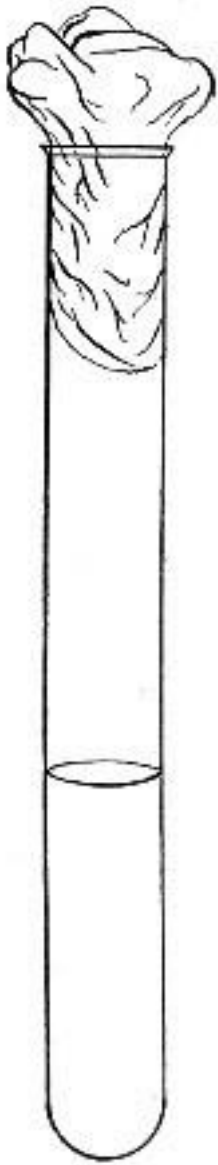


Рис. 119—Прямая трубка.

Культура встряхивания.—

1. Разжижите пробирку с питательным желатином (или агаром, или другой подобной средой), нагрев на водяной бане (рис. 121).
2. Инокулируйте разжиженную среду и маркируйте ее и т.д. Точно так, как если бы вы имели дело с тьюбиком бульона.
3. Установите только что вставленную пробирку в вертикальное положение (*например, в подставку для пробирок*) и дайте ей застыть.
4. Наклейте этикетку на пробирку; когда она станет твердой, инкубируйте.

Выращивание рулета Эсмарха.—

1. Разжижите три желатиновых тьюбика при нагревании.

2. Приготовьте три разведения инокулята (как описано для пластинчатого культивирования, стр. 228, этапы 4-7).

3. Скатайте трубочки, держа их почти горизонтально, в углублении, проделанном в кубике льда, пока желатин не застынет тонкой пленкой на внутренней поверхности трубочек (рис. 120); или под краном с холодной водой.

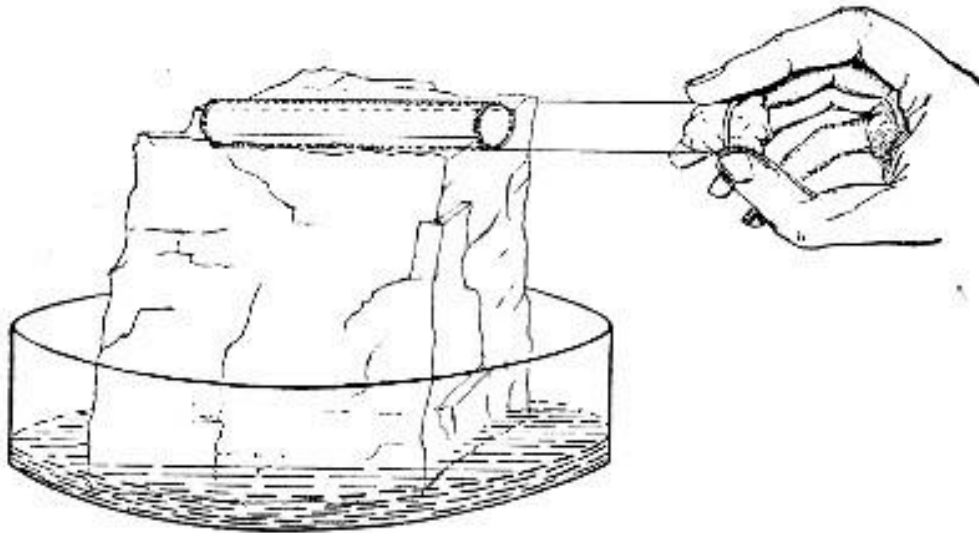


Рис. 120. Культура

рулета Эсмарха на куске льда.

Для того чтобы среда могла прочно прилипнуть к стеклу, содержание агара, используемого для выращивания рулонов, должно составлять 1%. желатина или 1%. гуммиарабик добавляют в него перед стерилизацией.

Рулонное культивирование, которое служило важнейшей цели до появления чашек Петри для пластинчатого культивирования, в настоящее время устарело в современных лабораториях и упоминается просто для удобства студентов, поскольку экзаменаторы, интересующиеся академическими и историческими аспектами бактериологии, иногда ожидают, что кандидаты будут знакомы с методом их приготовления.

Приготовление пластинчатых культур.

Если небольшое количество бактерий суспендировать в разжиженном желатине, агаре или другой подобной среде, а зараженную среду распределить ровным слоем по плоской поверхности и дать ей затвердеть, каждый отдельный микроорганизм закрепляется в определенном месте, и его дальнейшее развитие ограничивается окрестностями этого места. Через определенный промежуток времени рост этого организма становится виден невооруженным глазом как "колония". Это принцип, на котором основан метод пластинчатого культивирования, и его применение позволяет бактериологу изучать особый способ развития, на который влияет каждый вид микробов при неограниченном выращивании (а) на поверхности среды, (b) в глубине среды. Сам метод заключается в следующем:

Требуется аппаратура.—

1. Стойка для выравнивания штатива.

2. Большое неглубокое стеклянное блюдо, накройте его квадратным листом листового стекла.
3. Духовный уровень.
4. Ящик со стерильными чашками Петри.
5. Пробирки со стерильной питательной средой, желатин (или агар) предварительно разжижают при нагревании на водяной бане и охлаждают до 42°C. В противном случае нагрев среды уничтожил бы многие, если не все, введенные бактерии.
6. Трубка для выращивания, из которой нужно высаживать растения.
7. Платиновая петля.
8. Горелка Бунзена.
9. Смазать карандаш жиром.

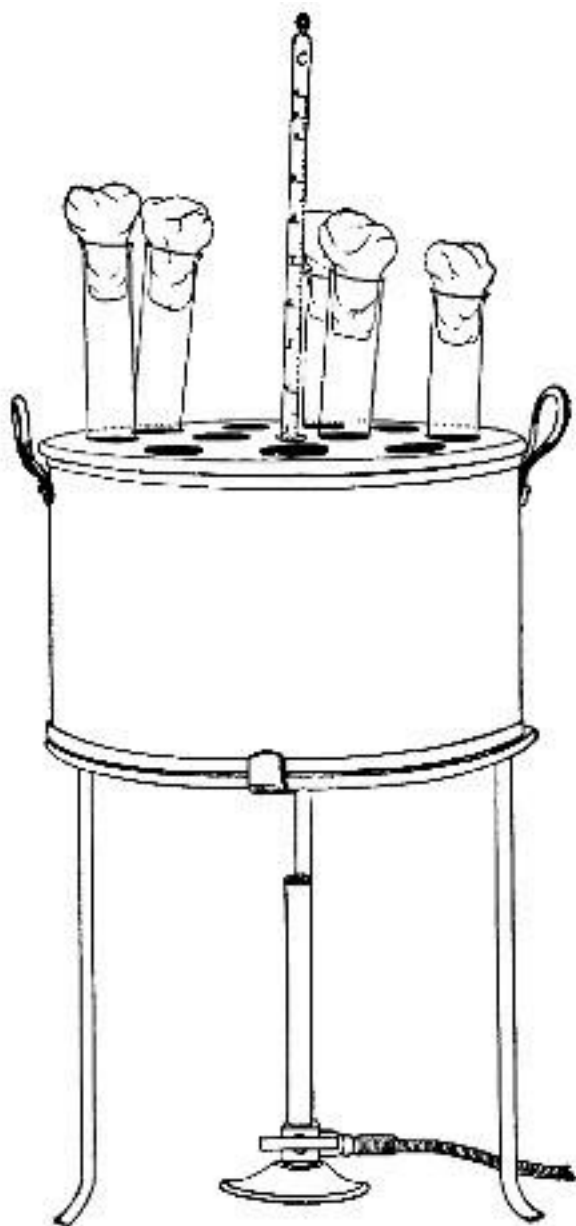


Рис. 121. Удобная форма водяной бани для расплавления трубочек с агаром и желатином перед их наклоном; или для приготовления коктейльных культур или разливочных тарелок.

Способ "Заливки" тарелок.—

1. Установите стеклянную посуду на штатив для выравнивания (рис. 122, 123); если необходимо разлить желатин по пластинам, залейте в посуду ледяную воду —желатин застывает так медленно, что необходимо ускорить процесс; если используется агар, залейте водой с температурой 50 °С. При комнатной температуре агар застывает почти мгновенно, и за счет небольшого замедления процесса можно избежать образования комков; накройте посуду квадратным листом стекла.

2. Установите спиртовой уровень на лист стекла и с помощью выравнивающих винтов отрегулируйте горизонтальность поверхности стекла.

Это выравнивание является важным вопросом, поскольку развитие колонии в некоторой степени пропорционально запасу среды, доступной для ее питания. Таким образом, при "мазке" культуры из наклонной пробирки колонии в верхней части среды низкорослые и мелкие, но увеличиваются в размерах и пышности роста по мере приближения ко дну пробирки, где находится наибольшая глубина среды.

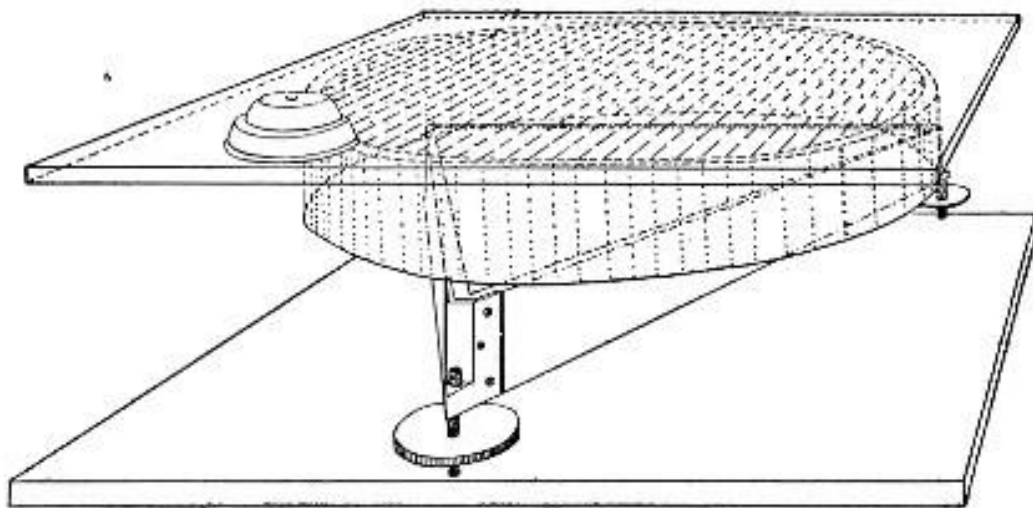


Рис. 122. Стенд для выравнивания плит.

3. Поставьте три стерильные чашки Петри в ряд на поверхность стеклянной пластины и пронумеруйте их 1, 2 и 3 слева направо.

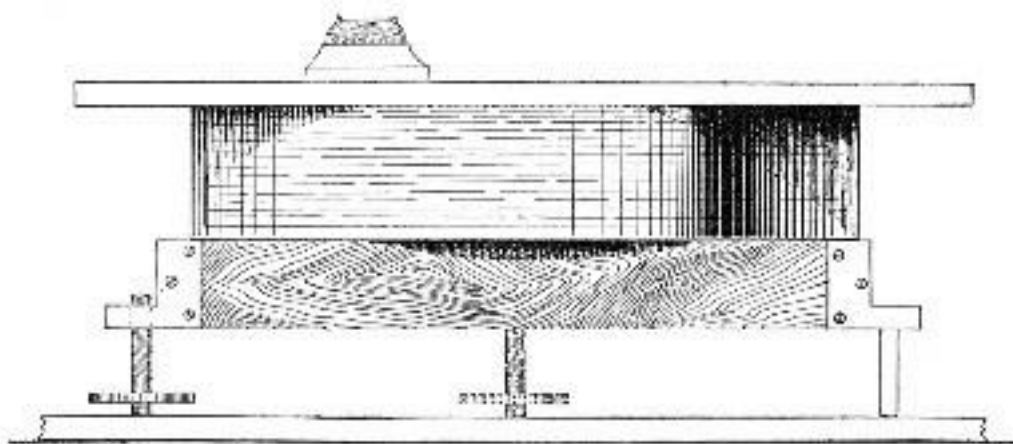


Рис. 123. Стенд для выравнивания плит, вид сбоку.

4. Пронумеруйте пробирки с предварительно сжиженной питательной средой 1, 2 и 3. Подождите пробки и убедитесь, что каждую пробку можно легко извлечь из горлышка соответствующей пробирки.

5. Добавьте одну порцию инокулята в пробирку № 1, обрабатывая разжиженную среду как бульон. После повторного введения возьмите пробирку большим и указательным пальцами правой руки рядом с горловиной и равномерными круговыми движениями всей руки

распределите инокулят по среде; избегайте резких движений, поскольку они вызывают образование пузырьков воздуха в среде.

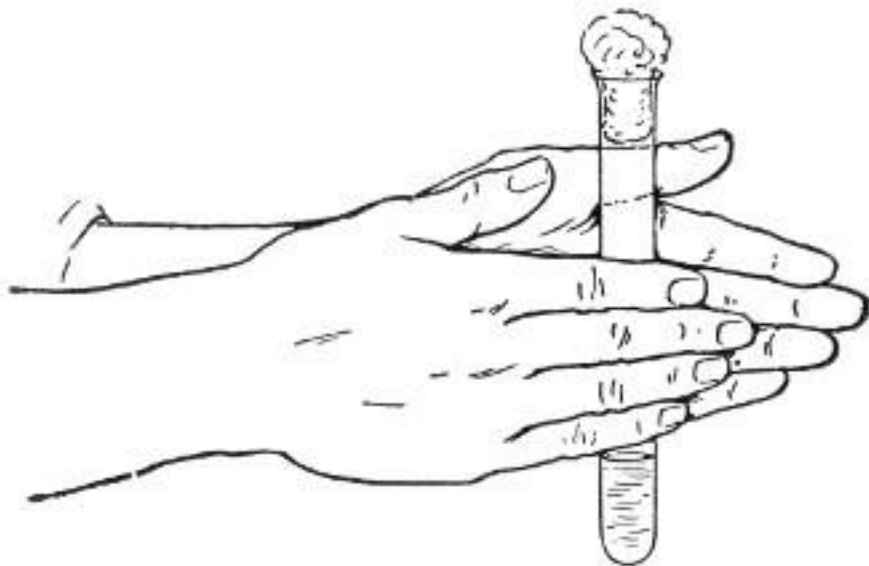


Рис. 124.Эмульсия для

смешивания пластин.

Этим методом не всегда легко добиться умения равномерно перемешивать без образования пузырьков воздуха. Альтернативный план заключается в том, чтобы держать трубку с прививкой вертикально между противоположными ладонями и вращать ее между ними быстрыми движениями двух рук вперед-назад (рис. 124).

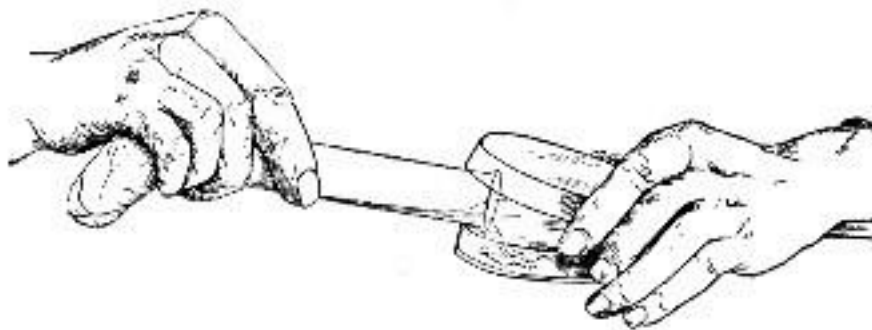


Рис. 125.Разливочные тарелки.

6. Простерилизуйте платиновую петлю, добавьте две полные петли разведенного инокулята в пробирку № 2 и перемешайте, как и раньше.

7. Аналогичным образом перелейте три полных цикла сжиженной среды из пробирки № 2 в пробирку № 3 и тщательно перемешайте.

8. Подожгите пробку пробирки № 1, снимите ее, затем подожгите горловину пробирки; слегка приподнимите крышку чашки Петри № 1, вставьте горловину пробирки; затем, приподняв дно пробирки, налейте разжиженную среду в чашку Петри, чтобы образовался тонкий слой. Снимите горловину пробирки и закройте "тарелку". Если среда не растекается равномерно по дну плиты, поднимите плиту с платформы для выравнивания и, наклоняя в разные стороны, устраните неисправность.

9. Аналогичным образом разлейте по тарелкам № 2 и № 3 из трубок № 2 и 3.

10. Наклейте на планшеты отличительное название или номер инокулята, а также дату; количество разведения было указано ранее (этап 3).

11. Поместите в прохладный инкубатор на три или более дней, по мере необходимости.

Таким образом, колонии могут быть получены совершенно чистыми и отделенными друг от друга.

На пластинке № 1, вероятно, колонии будут настолько многочисленными и скученными, а следовательно, настолько маленькими, что сделают ее бесполезной. На пластинке № 2 они будут более широко разделены, но обычно пластинка № 3 предназначена для тщательного изучения, так как на ней колонии обычно широко разделены, малочисленны и велики по размеру.

Пластины с агаром заливаются аналогичным образом, но перед засевом агар необходимо растопить в кипящей воде, а затем дать ему остыть до 45 ° С или 42 ° С. На тщательно регулируемой водяной бане, и весь процесс должен выполняться очень быстро, иначе агар затвердеет до завершения операции.

Примечание.—При разливке в тарелки, поскольку пробирка № 1 (для первого разведения) редко дает тарелку, представляющую какую-либо практическую ценность, ее часто заменяют пробиркой с бульоном или стерильным солевым раствором, и в таком случае тарелку № 1 не наливают.

Поверхностные пластины.—

Этот метод заливки того, что можно назвать "цельными" тарелками (поскольку колонии могут появляться как на поверхности, так и в глубине среды), важен для точного изучения образования колоний в различных условиях, но когда основной целью разделения бактерий является получение субкультур из ряда отдельных бактерий, должны быть подготовлены "поверхностные" тарелки, поскольку здесь образование колоний ограничено поверхностью среды. Используемый метод незначительно варьируется в зависимости от того, является ли используемая среда желатиновой или агаровой, или одним из производных или вариантов последнего.

(а) Пластинки с желатиновой поверхностью.—

1. Разжижите три тюбика питательного желатина.

2. Перелейте каждый тюбик в отдельную чашку Петри и дайте ему застыть. Затем переверните каждую тарелку вместе с крышкой вверх дном.

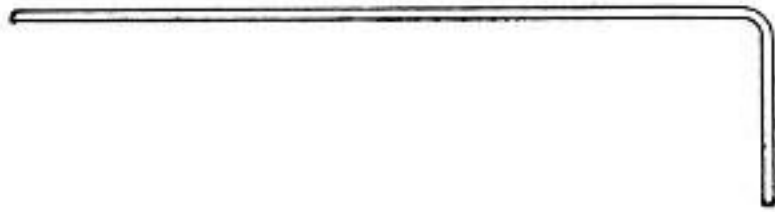


Рис. 126. Разбрасыватель

поверхностных плит.

3. Когда достаточно остынет, поднимите дно чашки 1, переверните ее и нанесите каплю инокулята (будь то жидкая культура или эмульсия из твердой культуры) на поверхность желатина с помощью платиновой петли— близко к одной стороне чашки; закройте нижнюю половину чашки Петри крышкой.
4. Возьмите кусок тонкой стеклянной палочки, толстую платиновую проволоку или, лучше всего, кусок алюминиевой проволоки (скажем, диаметром 2 мм) длиной около 28 см. Отогните концевую часть на 4 см. под прямым углом к остальной, сделав Г-образный стержень (рис. 126). Простерилизуйте короткую руку и прилегающую к ней часть длинной руки в пламени Бунзена и дайте им остыть.
5. Теперь поднимите дно чашки Петри левой рукой, оставив крышку на лабораторном столе, и, держа ее вертикально, размажьте каплю инокулята по всей поверхности желатина коротким рычагом разбрасывателя вращательными движениями (рис. 127). Снова накройте блюдо крышкой.
6. Приподнимите дно тарелки 2 и разотрите зараженный разбрасыватель по всей поверхности желатина, затем перейдите аналогичным образом к третьей тарелке из серии.
7. Простерилизуйте распылитель.
8. Наклейте этикетки на пластины и инкубируйте их.

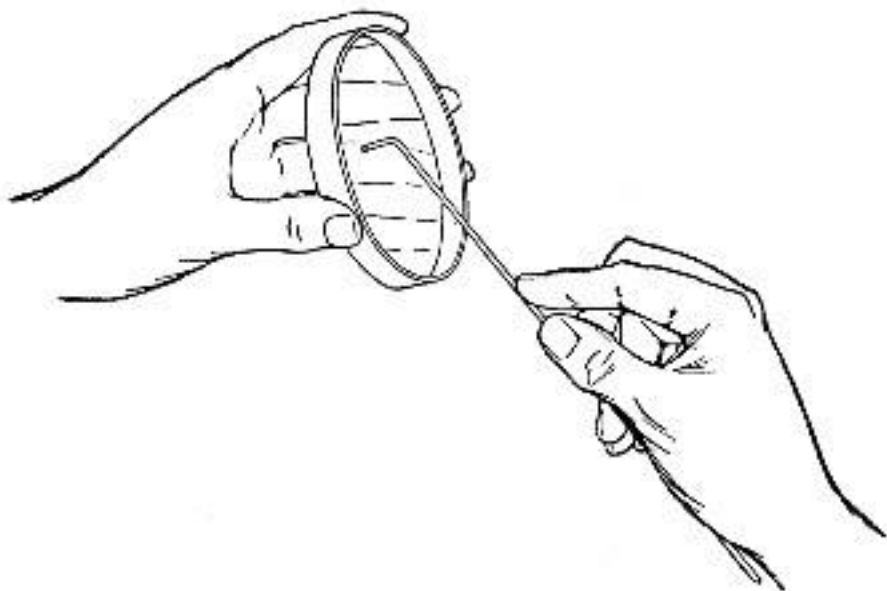


Рис. 127. Пластина с

растекающейся поверхностью.

После инкубации на пластинке № 1, вероятно, образуется огромное количество колоний; на пластинке 2 колоний будет меньше, поскольку на ее поверхности будут отложены только те бактерии, которые прилипнут к стержню после трения о пластинку 1, и к тому времени, когда стержень достигнет пластины 3, на ней должно остаться очень мало организмов. Так что на третьей пластинке, как правило, будет видно лишь очень мало разрозненных колоний, в высшей степени подходящих для детального изучения.

(b) Пластины с поверхностью из агара.—

1. Разжижите три пробирки питательного агара — нутрозного агара или подобного.
2. Перелейте каждый тюрбик в отдельную чашку Петри и дайте ему застыть.
3. Когда блюдо станет достаточно твердым, переверните его, приподнимите нижнюю половину и положите наискось на перевернутую крышку (рис. 128) и поместите в таком положении в инкубатор при температуре 60 ° C на сорок пять минут (или в инкубатор при температуре 42 ° C на два часа). Это испаряет конденсатную воду и придает средству твердую, сухую поверхность.
4. После извлечения тарелок из инкубатора закройте каждую посуду и поставьте ее — по—прежнему вверх дном - на лабораторный стол.

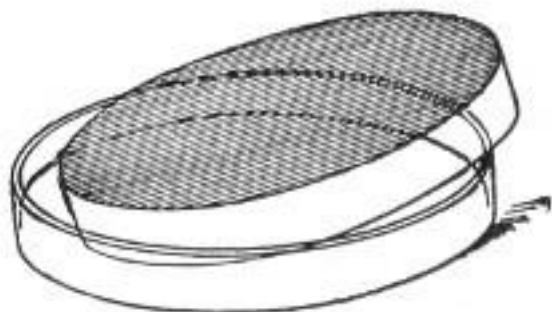


Рис. 128. Поверхность пластины для сушки агара.

5. Инокулируйте пластины последовательно по три, как описано для пластин с желатиновой поверхностью 3-8.

Выращивание методом подвешивания.

Требуется оборудование.—

Предметные стекла для подвешивания.

Обложки.

Подставка для секций (рис. 75).

Промокательная бумага.

Стекланный колпачок для покрытия предметных стекол.

Исходная культура.

Тюбики с бульоном, или разжиженным желатином, или агаром.

Пинцеты.

Платиновая петля.

Горелка Бунзена.

Смазочный карандаш.

Стерильный вазелин.

Лизол.

а) текучие среды.—

1. Приготовьте первое и второе разведения инокулята в соответствии с инструкциями для выращивания в пластинках (*видео*, страницы 228-229, разделы 4-6), заменив разжиженный желатин в пробирках питательным бульоном.

2. Простерилизуйте предметное стекло для подвешивания, тщательно промойте в воде и высушите, затем опустите его в мензурку с абсолютным спиртом, слейте большую часть спирта, возьмите предметное стекло пинцетом и сожгите остаток спирта на пламени.

3. Поместите предметное стекло для подвешивания на лист промокательной бумаги, смоченный 2-процентным раствором. растворите лизол и накройте его небольшим стеклянным колпаком, который был промыт тем же раствором и *не высушен*.

4. Слегка приподнимите стеклянный колпак и намажьте стерильным вазелином по краю металлической ячейки с помощью стерильной лопаточки из прочной платиновой проволоки.

5. Стерильными щипцами снимите чистую защитную пленку со спиртовницы и сожгите спирт; снова поднимите стеклянный колпачок и положите стерильную защитную пленку на промокательную бумагу сбоку от предметного стекла для подвешивания.

6. Извлеките каплю бульона из второй пробирки для разведения с помощью большой платиновой петли; поднимите стеклянный колпачок и нанесите каплю на центр покровного листа. Простерилизуйте петлю.

7. Приподнимите стеклянный колпачок настолько, чтобы можно было захватить щипцами накладку, перевернуть ее и закрепить над ячейкой предметного стекла для подвешивания. Полностью снимите стеклянный колпачок и плотно прижмите накладку к ячейке.

8. Либо инкубируйте и исследуйте через определенные промежутки времени, либо постоянно наблюдайте под микроскопом, при необходимости используя теплую подложку (рис. 53).

(b) **Твердая среда.**—Соблюдая в точности аналогичную технику, несколько капель разжиженного желатина или агара из второй пробирки для разведения можно нанести на поверхность стерильной покровной салфетки и таким образом подготовить пластину для выращивания в подвесных каплях.

Этот метод чрезвычайно полезен в связи с изучением дрожжей, когда круглую ячейку на предметном стекле для подвешивания следует заменить прямоугольной ячейкой размером примерно 38 на 19 мм, а желатин распределить по покровной пластине аналогичного размера. После герметизации препарата верхнюю поверхность титульного листа можно разровнять на квадраты с помощью жирного карандаша или ромбика и пронумеровать, чтобы облегчить последующую идентификацию колоний, которые, как наблюдается, развиваются из одиночных микробов.

Культура висячих блоков (Холм).-

Необходимый аппарат: Для культивирования методом подвешивания с добавлением скальпеля.

Выполняйте этот метод, насколько это возможно, под колпаком из стекла, чтобы избежать загрязнения с воздуха.

1. Разжижите пробирку с питательным агаром (или желатином) и налейте в чашку Петри на глубину около 4 мм и дайте застыть.
2. Острым скальпелем вырежьте квадратный брусок размером примерно 8 мм из всей толщины слоя агара.
3. Приподнимите агаровый брусок лезвием скальпеля и перенесите его нижней стороной вниз в центр стерильного предметного стекла.
4. Нанесите каплю жидкости для выращивания (или эмульсии для выращивания из твердой среды) на верхнюю поверхность агарового блока, как бы создавая защитную пленку.
5. Поместите предметное стекло и блок, закрытые колпаком, в инкубатор при температуре 37 ° C на десять минут для легкого подсыхания.
6. Возьмите пинцетом чистую сухую стерильную покровную пластинку и с помощью второй пары пинцетов осторожно опустите ее на инокулированную поверхность агара (избегая образования пузырьков воздуха) так, чтобы оставить чистый край покровной пластинки, перекрывающий агаровый блок.
7. Переверните препарат и лезвием скальпеля снимите предметное стекло с агарового блока.

8. Платиновой петелькой нанесите одну-две капли расплавленного агара по краям блока. Он сразу затвердевает и плотно прилегает к крышке блока.
9. Приготовьте стерильное предметное стекло для подвешивания и намажьте твердый вазелин или расплавленный белый воск по краю металлической ячейки.
10. Переверните накладку, прикрепив блок к направляющему для подвешивания, и надежно закрепите накладку на месте.
11. Соблюдайте меры предосторожности при выращивании методом свисания капель.

АНАЭРОБНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ.

Для культивирования анаэробных бактерий было разработано множество методов, большинство из которых требуют использования специального оборудования. Принцип, на котором основан любой метод и от которого зависит его успех, подпадает под ту или иную из следующих рубрик:

- (а) **Исключение доступа воздуха** при культивировании.
- (b) **удаление воздуха** из емкости, содержащей культивирование, с помощью воздушного насоса — *т.е.* культивирование *в вакууме*.
- (с) **поглощение кислорода** из воздуха, контактирующего с культивированием, с помощью пирогалловой кислоты, подщелачиваемой каустической содой, — *т.е.* культивирование в атмосфере азота.
- (d) **вытеснение воздуха** индифферентным газом, таким как водород или угольный газ, — *т.е.* культивирование в атмосфере водорода.
- (е) комбинация двух или более из вышеперечисленных методов.

Здесь приводится подборка самых простых и общепользованных методов.

По возможности питательные среды, используемые в любом из процессов, должны содержать какое-либо легко окисляемое вещество, такое как формиат натрия (0,4%) или сульфиндиготат натрия (0,1%), которые будут поглощать весь доступный кислород, удерживаемый средой в растворе. Дальнейшее добавление глюкозы в количестве 2% способствует росту анаэробных бактерий (*видео*, стр. 189-190).

Кроме того, рекомендуется заделать все стыки между резиновыми пробками и трубочками или горловины трубок расплавленным парафином; стеклянные пробки и краны следует смазать смоляной мазью или смесью из 1 части пчелиного воска и 4 частей оливкового масла.

(А) Метод I (метод Гессе).—

1. Сделайте колющий посев в желатине или агаре, выбрав для этой цели прямую пробирку, содержащую глубокую колонку среды, и воткните инокуляционную иглу в дно пробирки.
2. Нанесите слой стерилизованного масла (оливковое, вазелиновое или керосиновое масло) глубиной 1-2 см на поверхность среды.

3. Инкубировать.

Метод II.— Этот метод доступен только при работе с чистыми культурами.

1. Разжижите тюбик желатина (или агара) при нагревании, перелейте его в чашку Петри и дайте ему застыть.

2. Инокулируйте поверхность среды только в одном месте.

3. Снимите защитную пленку с емкости с абсолютным спиртом стерильными щипцами; сожгите спирт на газовом огне.

4. Осторожно опустите теперь уже стерильную защитную накладку на инокулированную поверхность среды, тщательно исключая пузырьки воздуха, и плотно прижмите ее кончиками щипцов. (Защитную накладку можно заменить стерильным диском из слюды.)

5. Инкубировать.

Метод III (Физический метод Ру).—

1. Приготовьте пробирные культуры жидких сред (или твердых сред, превращенных в жидкость при нагревании) обычным способом.

2. Отсосите немного инокулированной среды в капиллярные пипетки.

3. Опустите оба конца каждой пипетки в пламя паяльной трубки.

4. Инкубировать.

Метод IV (Биологический метод Ру).—

1. Сделайте глубокий укол, как в методе I.

2. Налейте на поверхность среды слоем глубиной 1-2 см бульон для выращивания энергичных аэробов —*например*, *B. aquatilis sulcatus* или *B. prodigiosus* — или столько же разжиженного желатина, который затем инокулируют аэробным организмом.

3. Инкубировать.

Рост аэроба израсходует весь поступающий к нему кислород и не позволит ему проникать в нижележащую среду, которая, следовательно, останется в анаэробном состоянии.

(В) **Способ V.**—

1. Подготовьте культуры в пробирках или колбах обычным способом.

2. Замените ватную пробку пробкой из каучука, перфорированной с одним отверстием и снабженной отрезком стеклянной трубки, которая выходит примерно на 3 см выше пробки и затем загибается под прямым углом (рис. 129). Пробку и стеклянную трубку стерилизуют путем кипячения в мензурке с водой в течение пяти минут.

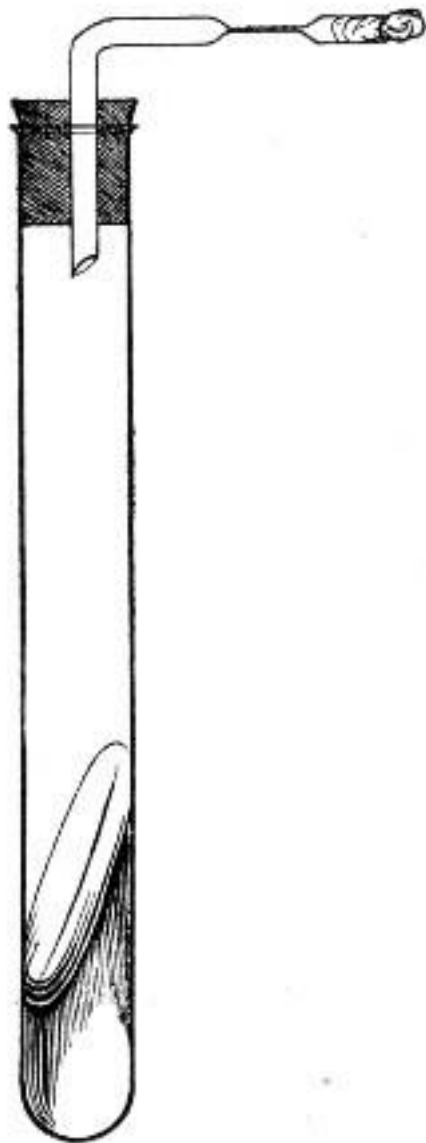


Рис. 129.Вакуумная культура.

3. Соедините трубку, идущую от емкости для культивирования, с водяным или воздушным насосом, вставив в нее флакон Вульфа, выполненный в виде промывочной бутылки и содержащий серную кислоту.
4. Выпустите воздух из емкости для культивирования.
5. Перед отсоединением аппарата закройте стеклянную пробирку от сосуда для культивирования в месте сужения, используя пламя паяльной трубки.
6. Инкубировать.

(С) **Метод VI** (метод Бюхнера).

Требуется оборудование и решения.—

Пробирка Бюхнера (прочная стеклянная пробирка длиной 23 см и диаметром 4 см, снабженная пробкой из индийской резины, рис. 130).

Пирогаллиновая кислота в прессованных таблетках, каждая из которых содержит по 1 грамму.
Деканонирующий раствор каустической соды.

Способ.—

1. Подготовьте почву для выращивания в трубках обычным способом.
2. Смочите резиновую пробку тюбика Бюхнера водой и убедитесь, что она точно прилегает к горловине тюбика.
3. Снимите пробку с бутылки с каустической содой.
4. Бросьте одну из таблеток пирогалловой кислоты[9] в пробирку Бюхнера (грубо говоря, используйте 1 грамм пирогалловой кислоты на каждые 100 °с объема приемного сосуда для воздуха).
5. Добавьте примерно 1 ч.л. содового раствора.
6. Поместите инокулированную пробирку внутрь пробирки Бюхнера. Пирогаллиновая таблетка действует как буфер и предотвращает повреждение либо пробирки с инокуляцией, либо пробирки Бюхнера, даже если ее вставить поспешно.
7. Плотно вставьте резиновую пробку в горловину трубки Бюхнера.

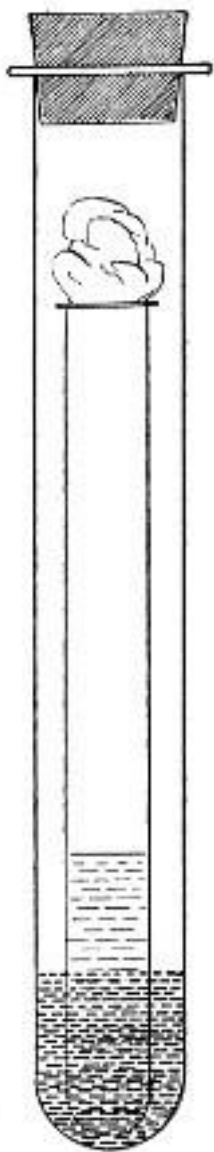


Рис. 130—Трубка Бюхнера.

Таблетка пирогалловой кислоты медленно растворяется в содовом растворе, и сначала ее окисление протекает очень медленно, так что при использовании этого метода остается достаточно времени.

8. Снова закройте бутылку с каустической содой.

9. Поместите пробирку Бюхнера в проволочную подставку и инкубируйте.

Метод VII (метод Райта).—

1. Подготовьте пробирное культивирование обычным способом.

2. Отрежьте ножницами ту часть ватной пробки, которая выступает над горловиной тюбика, затем вдавите пробку в тюбик на расстояние 2-3 см.

3. С помощью пипетки капните примерно 1 ч.л. пирогалловой кислоты 10 %. водный раствор на пробку. Он немедленно впитается ватой.

4. Другой пипеткой влейте равное количество раствора каустической соды.
5. Быстро закройте горловину тюбика плотно прилегающей пробкой из индийской резины.
6. Инкубировать.

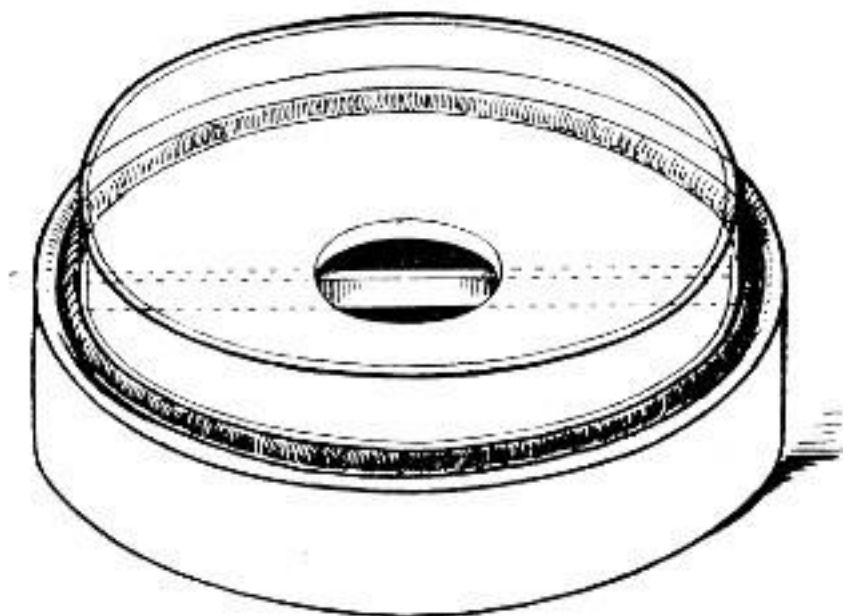


Рис. 131. Основание

анаэробной пластины Маклеода с перевернутой половиной чашки петри *in situ*

Метод VIII (метод Маклеода).—

Требуется оборудование и решения.—

Основание тарелки Маклеода (полый глазурованный фаянсовый диск диаметром 9 см и глубиной 2 см: в верхней поверхности проделано центральное отверстие диаметром 2 см, обеспечивающее доступ внутрь, нижняя часть которого разделена надвое низкой перегородкой. Неглубокая канавка опоясывает верхнюю поверхность ближе к краю).

Пластин.

Пирогалловую кислоту (1 грамм) в таблетках.

Таблетки гидроксида натрия (0,4 грамма) в прессованном виде.

Промойте бутылку дистиллированной водой.

Нанесите на пластины ту или иную агаровую среду (в чашках Петри диаметром 8 см).

Разбрасыватель поверхностных пластин.

Способ.—

1. Раскатайте длинный цилиндр из пластилина и вставьте его в углубление на верхней поверхности фаянсовой основы.
2. Поместите таблетку пирогалловой кислоты в одну часть внутренней поверхности основания пластины, а две таблетки гидроксида натрия - в другую.
3. Подготовьте культуру организма на поверхностных пластинках для культивирования.

4. Налейте несколько кубических сантиметров дистиллированной воды в то место основания пластины, где находится гидроксид натрия.
5. Переверните нижнюю половину пластины вверх основанием пластины и плотно вдавите ее края в пластилин, заполняющий углубление.
6. Маркируйте и инкубируйте.

(D) Способ IX.—

Требуется аппаратура.—

Маленькая фляжка Раффера или Вудхеда (рис. 33).

Стерильная Индия-резиновая пробка.

Индия-резиновая трубка.

Стеклянная трубка.

Металлические винтовые зажимы.

Баллон со сжатым водородом; или аппарат для подачи водородного газа

Способ.—

1. Простерилизуйте стеклянный сосуд, имеющий форму колбы Раффера или Вудхеда, в духовке с горячим воздухом. (Трубочка и боковые трубки заткнуты ватой.) После стерилизации прикрепите короткий отрезок резиновой трубки, закрытый металлическим зажимом, к каждой боковой трубке.
2. Инокулируйте большое количество (*например*, 200°с) среды. Там, где используются твердые среды, они должны быть сначала сжижены под действием тепла.
3. Извлеките ватную пробку из пробирки и перелейте инокулированную среду в стеклянный сосуд.
4. Закройте тубу пробкой из каучука, предварительно простерилизованной кипячением в мензурке с водой.

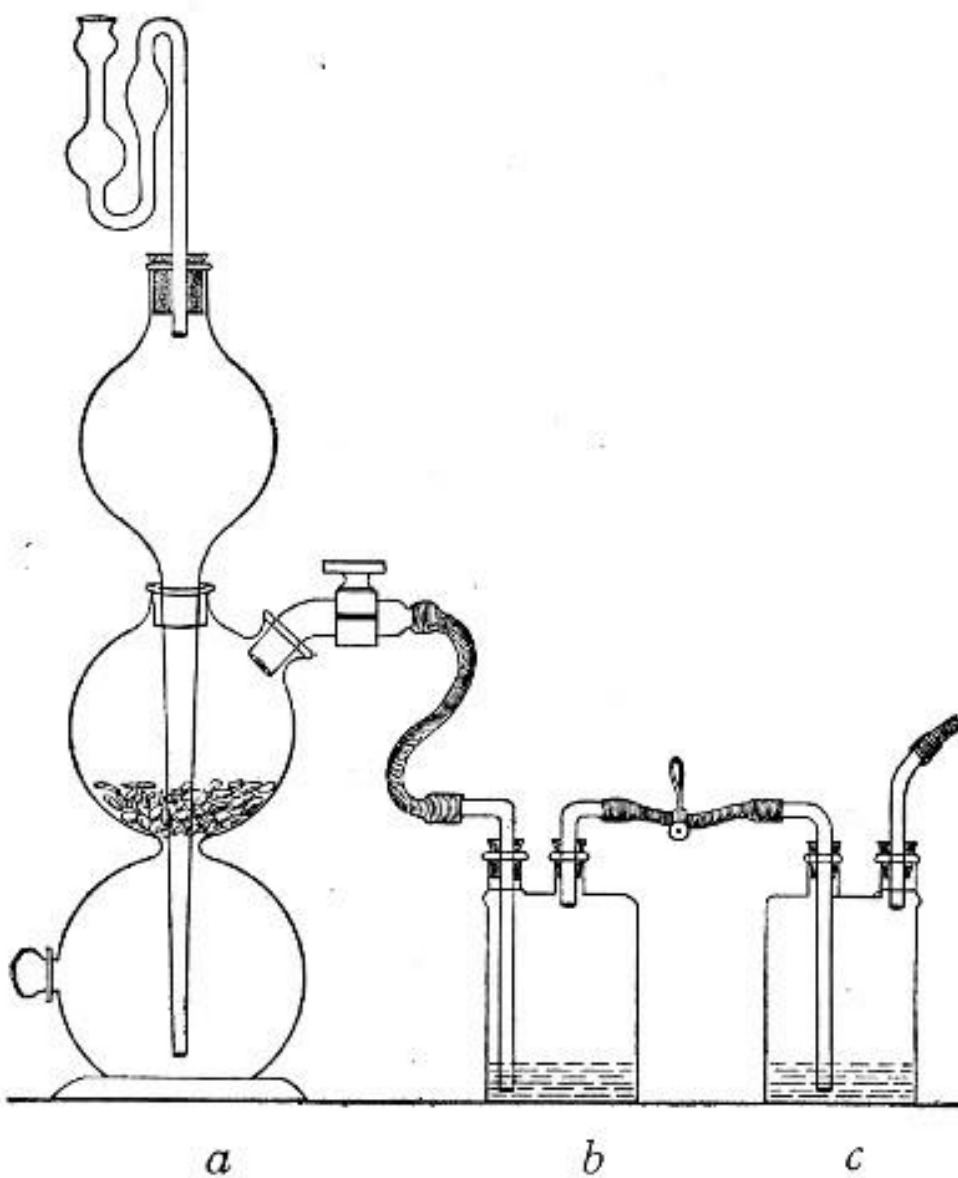


Рис. 132. —

Водородный аппарат Киппа, (а) соединенный с двумя промывочными бутылками, содержащими (б) 10% ацетата свинца. раствор для удаления H_2S и (с) раствор нитрата серебра для удаления зо́лы³. Третья промывочная бутылка, содержащая пирогалловую кислоту 10%. иногда вводят щелочной раствор для удаления любых следов кислорода.

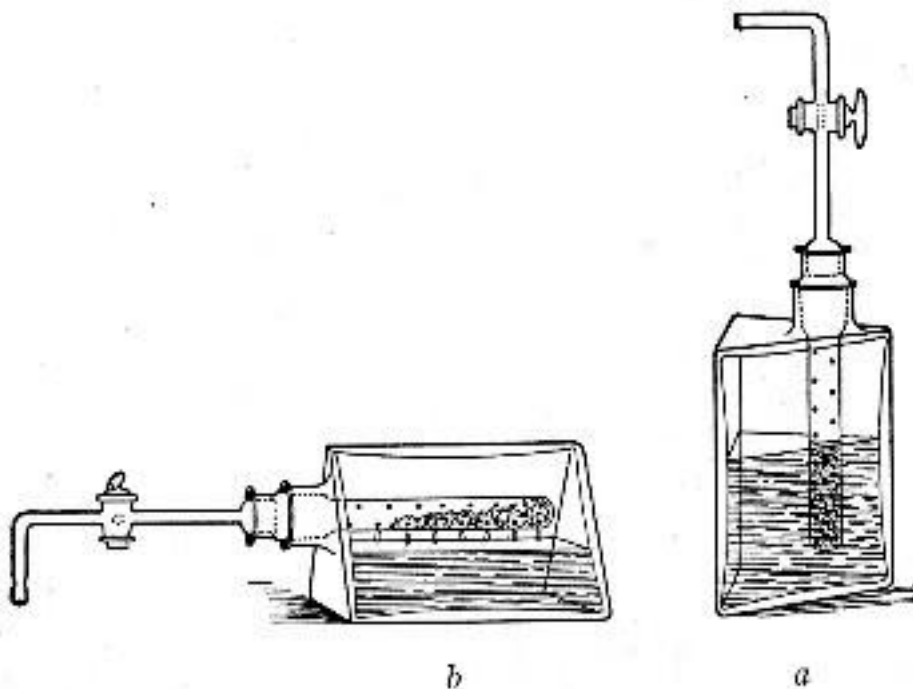


Рис. 133.

Усовершенствованный газовый аппарат; металл содержится в перфорированной стеклянной трубке, которая погружается в кислоту, когда треугольная бутылка стоит вертикально (а), но находится выше уровня жидкости, когда бутылка перевернута набок (б).

5. Подсоедините резиновую трубку на одной из боковых трубок к баллону со сжатым водородом (или к подающей трубке Кирр, рис. 132, или к другому водородному устройству, рис. 133), вставив короткий отрезок стеклянной трубки; и аналогичным образом подсоедините длинный отрезок резиновой трубки, которую следует опустить в бассейн с водой, к противоположной боковой трубке.

6. Откройте оба металлических зажима и пропускайте водород через сосуд до тех пор, пока атмосферный воздух не будет заменен водородом. Это определяется путем сбора части газа, который пузырится в воде в бассейне, в пробирку и тестирования его с помощью зажженной свечи.

7. Закройте металлический зажим на трубке, через которую поступает газ; закройте зажим на выходной трубке.

8. Отсоедините газовый аппарат.

9. Инкубировать.

Метод X (метод Боткина).—

Требуется аппаратура.—

Большое стеклянное блюдо диаметром 20 см и глубиной 8 см. Плоский свинцовый крест немного короче внутреннего диаметра стеклянной тарелки.

Стеклянный колпак диаметром около 15 см и диаметром от 20 до 25 см. высокая.

Металлическая рама для пластинчатых культиваторов.

Или стеклянный аккумулятор для выращивания в трубках.

Баллон со сжатым водородом.

Резиновая трубка.

Два отрезка стеклянной трубки **U-образной** формы (каждое плечо длиной 8 см).

Пол-литра глицерина (или металлической ртути).

Способ.—

1. Поместите свинцовый крест внутрь стеклянной формы так, чтобы он опирался на дно.
2. Подготовьте культуры обычным способом.
3. Поместите трубчатые культиваторы в стеклянный аккумуляторный контейнер (или пластинчатые культиваторы на металлической раме) так, чтобы они располагались по центру свинцового креста.
4. Накройте культуры колпаком.
5. Закрепите U-образные отрезки стеклянных трубок в вертикальном положении на противоположных сторонах стеклянной банки-колпака, по одному рукаву внутри банки, другой снаружи. Эти трубочки лучше всего удерживать на месте, вставив U-образные изгибы в два комочка гипсокартона, приклеенных ко дну стеклянной формы. Прикрепите короткий отрезок резиновой трубки, зажатой металлическим зажимом, к каждому из внешних рычагов (рис. 134).
6. Заполните стеклянную посуду глицерином или металлической ртутью на глубину около 5 см.

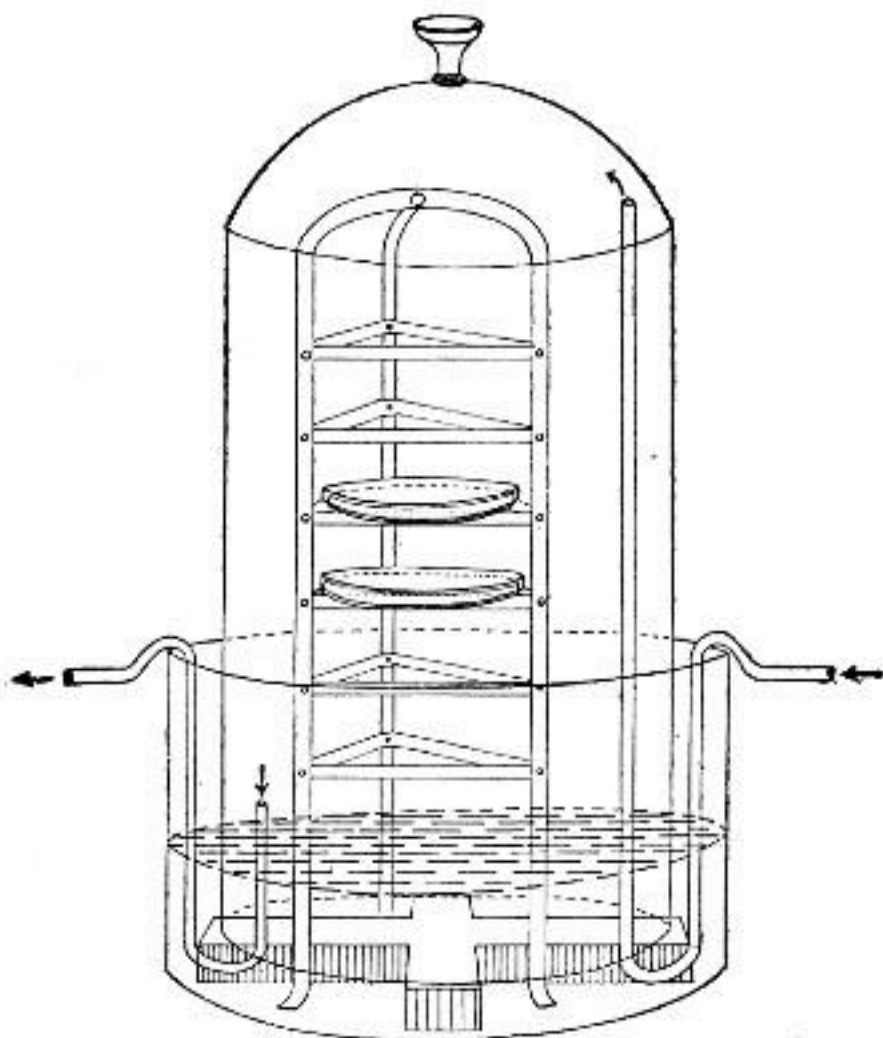


Рис. 134.—Аппарат Боткина.

7. Соедините одну U-образную трубку с водородным баллоном (или газовым аппаратом) с помощью резиновой трубки. Замените атмосферный воздух водородом, как в способе IX.

8. Зажмите трубки и отсоедините газовый аппарат.

9. Инкубировать.

Метод XI (Метод Нови).—

Требуется аппаратура.—

Банка для пластинчатого культивирования (рис. 135).

Или банка для выращивания в трубках (рис. 136).

Смазка для пробки банки.

Резиновая трубка.

Баллон со сжатым водородом.

Способ.—

1. Подготовьте культуры обычным способом.
2. Поместите их в банку.
3. Смажьте пробку и вставьте ее в горловину банки так, чтобы ручка находилась на одной линии с двумя боковыми трубками.
4. Подсоедините нагнетательную трубку *a* к системе подачи газообразного водорода с помощью резиновой трубки.

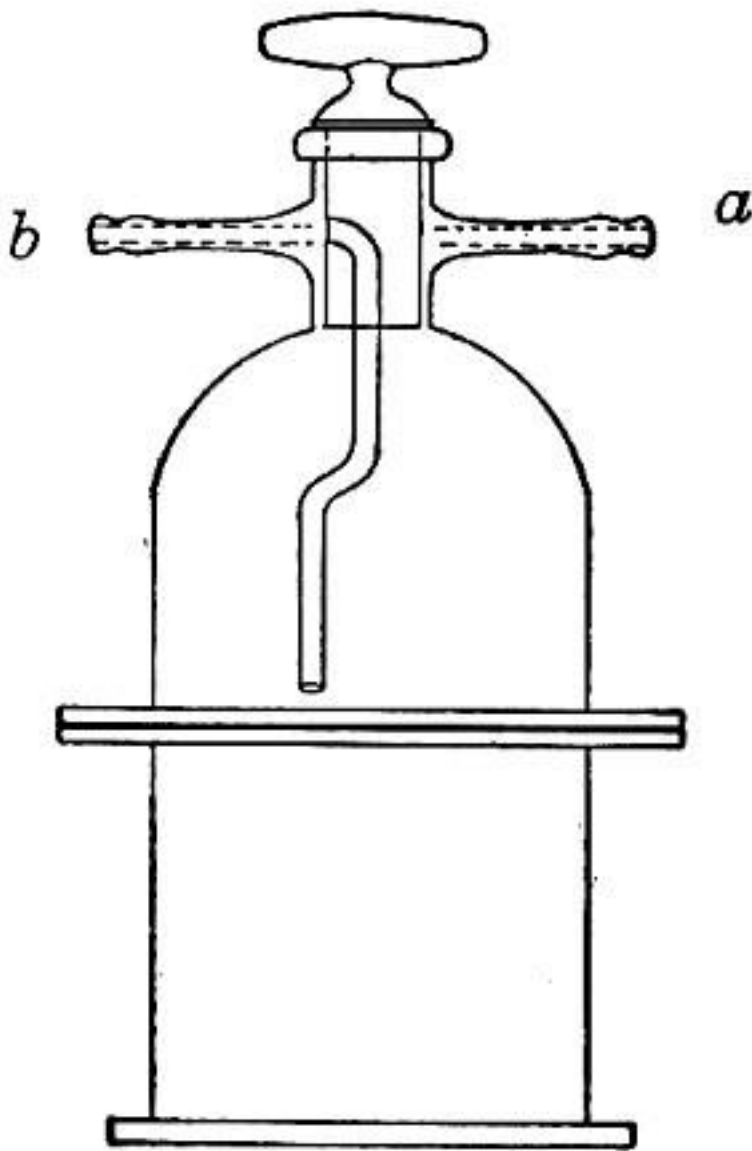


Рис. 135.—Банка Novy для
пластинчатого культивирования.

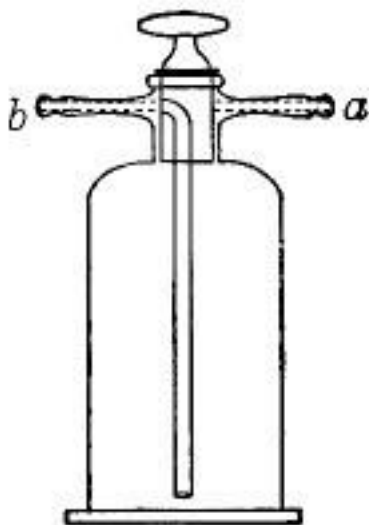


Рис. 136. Банка Novy для выращивания в трубках.

5. Прикрепите кусок резиновой трубки к выходной трубке *b* и отбирайте пробы выделяющегося газа (поверх воды) и время от времени проводите тесты.
6. Когда воздух будет полностью вытеснен водородом, поверните ручку заглушки под прямым углом к линии входной и выходной трубок; это герметизирует отверстия обеих трубок.
7. Отключите газовый аппарат и инкубируйте.

(Е) **Метод XII** (метод Буллоха).—

Требуется аппаратура.—

Кувшин Буллоха.

Горшочек со смоляной мазью.

Маленькое стеклянное блюдо диаметром 14 см и глубиной 5 см.

Сосуд для трубчатых культур или металлическая подставка для пластинчатых культур.

Таблетки пирогалловой кислоты.

Баллон со сжатым водородом.

Герык или другой воздушный насос.

Резиновая трубка для давления.

Пипетка на 10 мл.

Стеклянная трубка.

Сухая гранулированная каустическая сода или прессованные таблетки, каждая из которых содержит

0,4 грамма гидроксида натрия.

Маленький стакан с водой.

Способ.—

1. Подготовьте культуры обычным способом.
2. Поместите стеклянную посуду в центр стеклянной плиты и поместите в нее культуры.

3. Положите достаточное количество таблеток пирогалловой кислоты с одной стороны стеклянной емкости (*т.е.* по 1 таблетке на каждые 100 кубических сантиметров емкости для воздуха). Положите небольшую горку сухой гранулированной соды (или полдюжины таблеток гидроксида натрия) рядом с поджигательными таблетками.
4. Смажьте фланец стеклянной банки смоляной мазью и плотно приложите банку к стеклянной пластинке, закрывая углубления, расположив ее так, чтобы длинная трубка своим нижним концом входила в стеклянную чашку в точке, прямо противоположной таблеткам пирогалловой кислоты. Смажьте два запорных крана смоляной мазью (рис. 137).
5. Подсоедините короткую трубку *a* к системе подачи газа с помощью резиновой напорной трубки и откройте оба запорных крана.
6. Подсоедините длинный прямой кусок стеклянной трубки к длинной трубке *b* с помощью отрезка резиновой трубки, вставленного между винтовыми зажимами: время от времени отбирайте пробы выделяющегося газа и проводите испытания.
7. Когда воздух вытеснится, перекройте запорный кран входной трубки, затем выходной *b*. Завинтите зажим, снимите стеклянную трубку с резинового соединения и подсоедините короткую трубку *a* к воздушному насосу с помощью напорной трубки.
8. Откройте запорный кран трубки *a* и двумя или тремя ударами воздушного насоса откачайте небольшое количество газа, создав таким образом небольшое разрежение. Затем перекройте запорный кран и отсоедините воздушный насос.
9. Наполните водой 10-градусную пипетку; вставьте ее наконечник в резиновую трубку на длинной трубке *b* до винтового зажима. Откройте винтовой зажим и запускайте воду до тех пор, пока внутреннее давление не остановится. Закройте запорный кран. (Вода растворяет соду и пирогалловую кислоту, превращая последнюю в пирощелочную щелочь. и таким образом приводит в действие свою скрытую способность к кислороду).

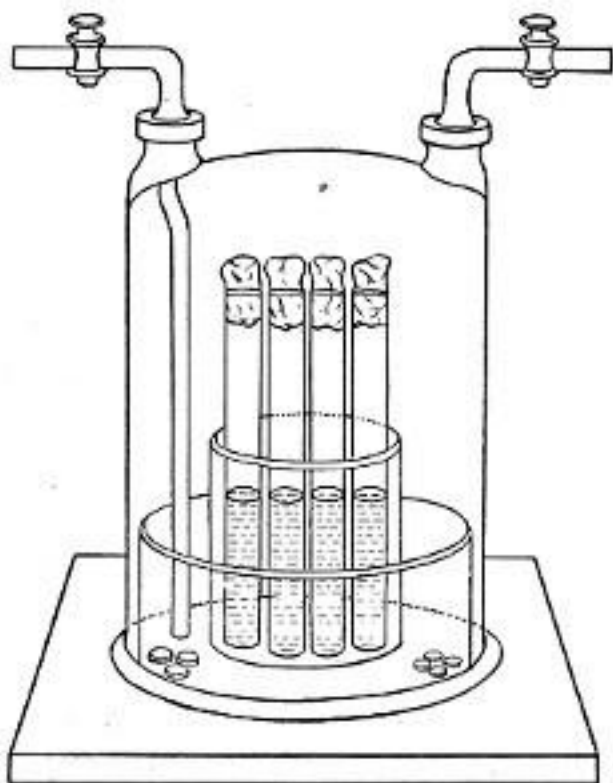


Рис. 137. Банка Буллоха.

10. Выньте пробирки из тубуляров так, чтобы они соприкасались поверх стеклянной крышки; еще раз убедитесь, что все соединения плотно затянуты, и перенесите устройство в инкубатор.

Этот последний метод является наиболее удовлетворительным для анаэробного культивирования, поскольку с его помощью можно добиться полного анаэробнозиса с наименьшими затратами времени и хлопот.

СНОСКИ:

[8] Смотрите также метод открытия и закрытия пробирок для культивирования, страницы 74-76.

[9] Если невозможно получить прессованные таблетки пирогалловой кислоты, приготовьте исходный раствор "acid pyro"

Пирогалловая кислота, 10 граммов

Соляной кислоты, 1,5 стакана

Дистиллированной воды, 100 граммов

и на шаге 4 залейте 10 г раствора.

XV. МЕТОДЫ ИЗОЛЯЦИИ.

Работа в предыдущих разделах, организованная для демонстрации основных биологических характеристик бактерий в целом, предназначена для выполнения посредством культивирования различных организмов, предварительно выделенных и идентифицированных и предоставляемых учащимся в чистом виде. Культивирование, включающее потомство одной клетки, называется "чистой культурой"; о культуре, содержащей представителей двух или более видов бактерий, говорят как о "нечистой" или "смешанном" "культивировании", и теперь становится необходимым указать основные методы, с помощью которых один или несколько организмов могут быть выделены в чистом состоянии из смеси; существует ли эта смесь в виде нечистого лабораторного культивирования или содержится в гное и других болезненных выделениях, инфицированных тканях, воде или продуктах питания.

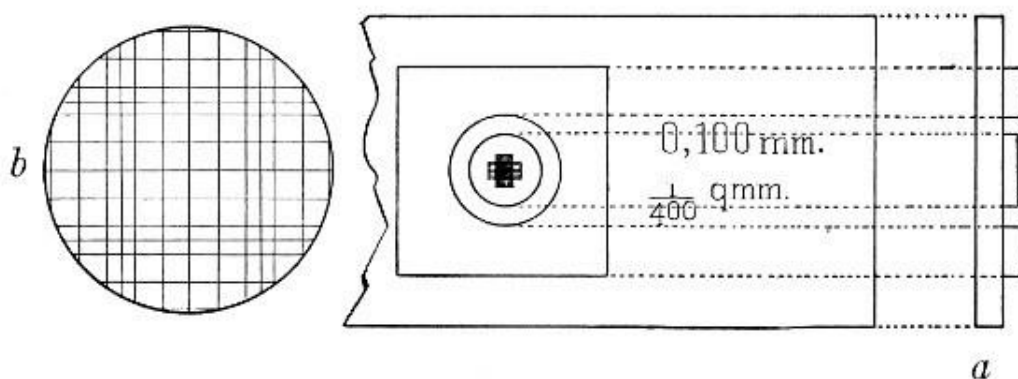


Рис. 138. Ячейка гематоцитометра, показывающая, а, разрез по центру ячейки, и б, увеличенное изображение границ ячейки.

До введения твердых сред единственным методом получения чистых культур было "разбавление" — отнюдь не надежный метод. "Разбавление" состояло в приблизительной оценке количества бактерий, присутствующих в данном объеме жидкости (с помощью предметного стекла с градуированными ячейками, напоминающего гематоцитометр, рис. 138), и разбавлении жидкости добавлением стерильной воды или бульона до тех пор, пока в заданном объеме (обычно 1 куб. см) разведения не останется только один организм. При заливке этого объема жидкости в несколько пробирок или колб с питательной средой иногда случалось, что результирующий рост был продуктом одного отдельного микроба. К счастью, столь ненадежный метод в настоящее время заменен многими другими, более надежными и удобными, и с помощью этих методов, выбранных для описания здесь, может быть произведена сегрегация и выделение требуемых бактерий —

А. Путем механического разделения.

1. Путем обработки поверхности пластины:

- (a) Желатин.
- (b) Агар.
- (c) Сывороточный агар.
- (d) Кровяной агар.

(е) Висячий-падение или блок.

[2. По свитку Эсмарха:

Этот архаичный метод (см. стр. 226) больше не используется для выделения бактерий.]

3. Путем серийного выращивания.

Б. Путем биологической дифференциации.

4. С помощью дифференциальных сред.

(а) Избирательный.

(b) Сдерживающий фактор.

5. Путем дифференциальной инкубации.

6. Путем дифференциальной стерилизации.

7. Путем дифференциального культивирования атмосферы.

8. Путем прививки животным.

Выбор метода для применения в любом конкретном случае будет зависеть от множества обстоятельств, и часто комбинация двух или более методов обеспечивает более быстрый и надежный результат, чем жесткое следование какому-либо одному методу. Единственным надежным ориентиром является опыт, но, как правило, использование либо первого, либо третьего метода будет признано наиболее удобным, поскольку каждый из них дает возможность одновременного выделения нескольких или всех разновидностей бактерий, присутствующих в смеси.

1. Обработка поверхности пластин.—

(а) Желатин (вид стр. 164).

(b) Агар (вид стр. 167).

(с) Щелочной сывороточный агар (видео, стр. 211).

Эти пластины готовятся способом, в точности аналогичным тому, который применяется для пластин с поверхностью из питательного желатина и агара (видео, стр. 231-233).

(d) Сывороточный агар.—

1. Растопите три пробирки с питательным агаром, наклейте на них этикетки 1, 2 и 3 и поместите их вместе с тремя пробирками со стерильной жидкой сывороткой, также помеченными как 1а, 2а и 3а, на водяную баню с регулируемой температурой 45 ° C; дайте пройти достаточному времени, чтобы температура содержимого каждой пробирки достигла температуры водяной бани.

2. Возьмите пробирку с сывороткой № 1а и пробирку с агаром № 1. Подожгите пробки и извлеките их из пробирок (удерживая пробку пробирки с агаром в руке); подожгите горловины пробирок, перелейте сыворотку в пробирку со сжиженным агаром и замените пробирку с агаром.
3. Тщательно перемешайте и залейте тарелку № 1 *secundum artem*.
4. Аналогичным образом обработайте оставшийся тюрбик с агаром и сывороткой и разлейте по тарелкам № 2 и 3.
5. Высушите чашки с сывороточным агаром в инкубаторе, работающем при температуре 60°C, в течение одного часа (см. стр. 232).
6. Инокулируйте пластины последовательно, как описано для пластин с желатиновой поверхностью (стр. 231).

(е) *Кровяной агар человека.*—

1. Растопите тюрбик со стерильным агаром и перелейте его в стерильную тарелку; дайте ему застыть.
2. Соберите несколько капель крови человека при соблюдении всех асептических условий в стерильную капиллярную сосковую пипетку.
3. Слегка приподнимите крышку чашки Петри, вставьте кончик капиллярной пипетки и нанесите кровь по центру поверхности агара. Закройте блюдо.
4. Зарядите платиновую петлю небольшим количеством инокулята. Поднимите крышку тарелки, вставьте петлю, смешайте ее содержимое с каплей крови, снимите петлю, закройте посуду и простерилизуйте петлю.
5. В завершение нанесите смесь на поверхность агара стерилизованной Г-образной палочкой.
6. Маркируйте и инкубируйте.

(При необходимости могут быть последовательно инокулированы две, три или более одинаковых пластины.)

(f) *Кровяной агар животного происхождения.*—

При приготовлении цитратного кровяного агара (стр. 171) всегда рекомендуется разлить по чашкам несколько пробирок с кровяным агаром, которые можно хранить в холодильнике, готовые к использованию в любой момент для поверхностных посевов.

(g) Подвесная культура или блочная культура, (видео, стр. 233).

3. Серийное выращивание.—Обычно их готовят на агаре или сыворотке крови, хотя можно использовать и желатин.

Способ заключается в следующем:

1. Возьмите по крайней мере четыре "наклонных" тюрбика со средой и последовательно пронумеруйте их.

2. Подожгите все пробки и убедитесь, что каждую из них можно легко извлечь.
3. Зарядите платиновую петлю небольшим количеством инокулята, соблюдая обычную процедуру, и посадите пробирку № 1, тщательно размазав по всей поверхности. Если на дне тюбика скопилось немного конденсата, используйте его в качестве разбавителя, прежде чем размазывать содержимое петли по поверхности средства.
4. Не стерилизуя и не перезаряжая петлю, инокулируйте пробирку № 2, сделав три параллельных штриха от конца к концу наклонной поверхности.
5. Расположите остальные тюбики в ряд "мазками", как тюбик № 1.
6. Этикетка с характерным названием или номером и датой; инкубировать.

Рост, который последует в первых двух или трех пробирках серии, вероятно, будет настолько плотным, что станет бесполезным. Однако ближе к концу серии будут обнаружены отдельные колонии, каждую из которых можно перенести в свежую пробирку с питательной средой без риска заражения соседними колониями.

"Обрабатываю" пластины.—

После успешного получения планшетного (или пробирного) культивирования, в котором колонии хорошо выращены и достаточно отделены друг от друга, теперь необходимо продолжить процесс "обработки", "выколачивания" или "вылавливания" колоний с целью получения субкультур в состоянии чистоты из каждой из различных присутствующих бактерий.

Иногда бывает так, что это довольно простой вопрос. Например, при микроскопическом исследовании исходного смешанного культивирования было обнаружено, что оно содержит грамположительный микрококк, грамположительную прямую бациллу и грамотрицательную короткую бациллу. Третья желатиновая пластинка, приготовленная из этой смеси, при осмотре после четырехдневной инкубации показала двадцать пять колоний — семь влажных желтых колоний, каждая из которых погружалась в неглубокую ямку со сжиженным желатином, четырнадцать плоских радужных пленчатых колоний и четыре приподнятых белых слизистых колонии. Пленочный препарат (окрашенный по граму) от каждого сорта, исследованный микроскопически, показал, что желтая разжижающая колония состояла из грамположительных микрококков; плоская колония грамположительных бацилл и белая колония грамотрицательных бацилл. По одной колонии каждой из этих разновидностей будут перенесены с помощью стерилизованной петли в пробирку для культивирования свежего желатина, и после инкубации рост каждой субкультуры будет соответствовать культуральному и микроскопическому росту колонии на пластинке, из которой она была получена, — таким образом, будет достигнута поставленная цель.

Обычно, однако, колонии не могут быть так легко дифференцированы, и если они не будут "обработаны" упорядоченным и систематическим образом, то много труда будет потрачено впустую, а ценное время потрачено впустую. Следующий метод сводит к минимуму связанные с этим трудности.

А) инспекция.

а. Не открывая пластинку, тщательно изучите различные колонии невооруженным глазом, с помощью часового объектива или перевернув пластинку на подставке микроскопа и просматривая с помощью 1-дюймового объектива дно пластинки и слой среды.

б. Если могут быть обнаружены значительные различия, отметьте жирным карандашом небольшой кружок на дне пластины вокруг каждой из выбранных колоний.

с. Если не удастся разглядеть очевидных различий, выберите девять колоний в случайном порядке и укажите их положение карандашными пометками на дне пластины.

В) рыболовецкие колонии.—

а. Возьмите стерильную чашку Петри и переверните ее на лабораторном столе. Проведите жирным карандашом две параллельные линии на дне блюда и еще две параллельные линии под прямым углом к первой паре — так вы разделите площадь блюда на девять частей. Пронумеруйте верхнюю правую часть 1, а центральную нижнюю часть 8 (рис. 139). Переверните блюдо. Цифры 1 и 8 легко распознаются через стекло, а их расположение позволяет определить местонахождение любого из других отделов по номеру. Это блюдо для бульона.

б. Слегка приподнимите крышку чаши и с помощью стерильной сосковой пипетки нанесите небольшую каплю стерильной воды в центр каждого из девяти отделений.

с. стерилизованной платиновой лопаточкой поднимите одну из отмеченных колоний с "тарелки 3", перенесите ее на первое деление линейчатой тарелки и эмульгируйте в ожидающей ее капле воды. Повторите этот процесс с оставшимися колониями, эмульгируя по отдельной колонии в каждой капле воды.

(С) Предварительная дифференцировка бактерий.—

а. Приготовьте препарат для нанесения защитной пленки из каждой капли эмульсии в "чашке для бульона" и укажите количество, соответствующее подразделению, из которого она была взята. Окрашивание по методу Грэма.

б. Исследуйте под микроскопом, используя масляную иммерсионную линзу, и отметьте количество покровных пленок, которые морфологически и по граммам, по-видимому, состоят из различных видов бактерий.

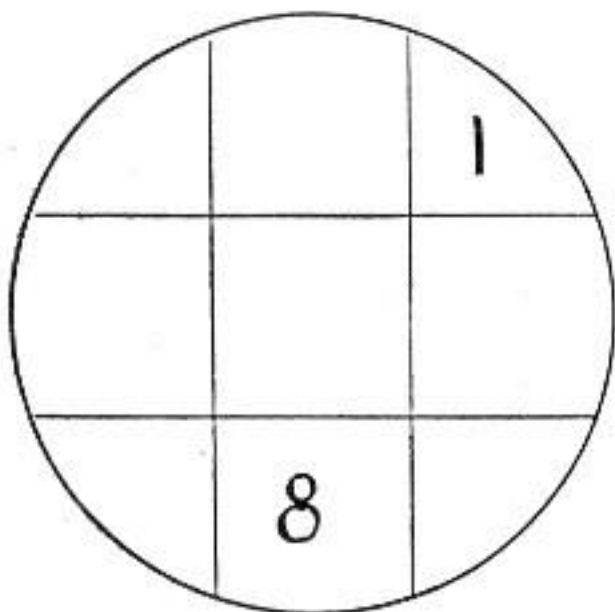


Рис. 139.Схема заготовки.

(D) подготовка субкультур изоляции.—

а. Инокулируйте агаровый скат и бульонный тюбик из эмульсии в чашке для бульона, соответствующие каждому из этих специально выбранных чисел.

б. Убедитесь, что покровные пленки из девяти эмульсий в форме бульона содержат все разновидности, представленные в препарате для нанесения покровной пленки, приготовленном из исходной смеси перед нанесением покрытия.

с. Если отсутствуют некоторые сорта, приготовьте второе блюдо из других колоний на тарелке 3 и повторяйте процесс до тех пор, пока каждая морфологическая форма или тинкториальный сорт не будут закреплены в субкультуре.

г. Поставьте посуду с бульоном в морозильную камеру для ожидания результатов инкубации. (Если какая-либо из субкультур не удалась, из соответствующей эмульсии можно получить дополнительный материал; или, если она высохла, увлажнив ее еще одной каплей стерильной дистиллированной воды.)

т.е. Инкубируйте все субкультуры и идентифицируйте выбранные организмы.

4. Дифференциальные среды.—

(а) *селективный*.—Некоторые разновидности питательных сред особенно подходят для определенных видов бактерий и позволяют им разрастаться и в конечном итоге вытеснять другие разновидности; например, сусло является наиболее подходящей питательной основой для роста торул и дрожжей, и его следует использовать при разливке в чашки для выделения этих организмов. Чтобы получить чистое культивирование дрожжей из смеси, содержащей также бактерии, часто бывает достаточно инокулировать сусло из смеси и инкубировать при 37° С в течение двадцати четырех часов. Возьмите свежую пробирку с суслом из полученной наростки и инкубируйте. Повторите процесс еще раз, и из наростки в этой третьей пробирке

нанесите полоску на желатин сусли и инкубируйте при 20 °С. Полученный в результате рост почти наверняка будет представлять собой чистую культуру дрожжей.

(b) *Сдерживающий фактор*.—Также имеет место обратное из вышесказанного. Определенные среды обладают способностью подавлять рост большего или меньшего числа видов. Например, среды, содержащие карболовую кислоту в количестве 1%. будет подавлять рост практически всего, кроме *Bacillus coli communis*.

5. Дифференциальная инкубация.—

При выделении определенных бактерий используется тот факт, что у разных видов различается оптимальная температура. Смесь, содержащую *Bacillus typhosus* и *Bacillus aquatilis sulcatus*, например, можно поместить в две наклонные пробирки с агаром, одну инкубировать при 40 °С, а другую - при 12 °С. После двадцатичетырехчасовой инкубации в первой будет показано чистое культивирование *Bacillus typhosus*, в то время как вторая будет представлять собой почти чистую культуру *Bacillus aquatilis*.

6. Дифференциальная стерилизация.—

(a) *неспоровые бактерии*.—Аналогичным образом, можно воспользоваться различными точками тепловой гибели бактерий. Из смеси двух организмов, точки термической гибели которых отличаются, скажем, на 4 °С. -например, *Bacillus pyocyaneus*, точка термической гибели 55°С., и *Bacillus mesentericus vulgaris*, точка термической гибели 60°С. —чистое культивирование последнего может быть получено путем нагревания смеси на водяной бане до 58 °С. и поддержания ее при этой температуре в течение десяти минут. Затем смесь высаживают на свежую среду и инкубируют, когда будет обнаружено, что полученный рост полностью состоит из *B. mesentericus*.

(b) *Споровые бактерии*.—Этот метод находит свое основное практическое применение в дифференциации организма, несущего споры, от организма, не образующего спор. В этом случае смесь нагревают на водяной бане при температуре 80°С в течение пятнадцати-двадцати минут. По истечении этого времени неспорообразующие бактерии погибают, и культивирование, произведенное из смеси, даст рост, возникающий только в результате прорастания спор.

Дифференциальную стерилизацию при температуре 80°С удобнее всего проводить в водяной бане специальной конструкции, разработанной Balfour Stewart (рис. 140). Он состоит из медного сосуда с двойными стенками, установленного на ножках и снабженного трубкой, сообщающейся с пространством между стенками. Это пространство почти заполнено бензолом (температура кипения 80 °С; для этой цели следует использовать чистый бензол, не содержащий тиофена, в противном случае температура кипения постепенно и заметно повышается с течением времени), а к трубке присоединена длинная стеклянная трубка длиной около 2 метров и диаметром около 0,75 см, служащая конденсационной трубкой (трубка вдвое меньшей длины, если она снабжена конденсационной колбой в центре, будет столь же эффективной). Внутренняя часть сосуда частично заполнена водой и закрыта крышкой с отверстиями для термометра. Этот термометр опускается в воду и регистрирует ее температуру. Очень маленького пламени Бунзена под прибором достаточно, чтобы поддерживать кипение бензола и постоянную температуру воды внутри на уровне 80 °С. Таким образом, ванна всегда готова к использованию.

Способ.—Использовать аппарат.

1. Поместите часть самой смеси, если она жидкая, содержащая споры, или такую же эмульсию, если она получена из твердого материала, в пробирку.
2. Погрузите пробирку в воду, содержащуюся в ванне с бензолом, следя за тем, чтобы верхний уровень жидкости в пробирке был по крайней мере на 2 см ниже поверхности воды в медном сосуде.
3. Температура воды, конечно, падает на несколько градусов после открытия ванны и введения в нее более холодной жидкости, но через несколько минут температура снова достигнет 80 °С.
4. Когда термометр снова покажет 80 °С, засеките время и через пятнадцать минут извлеките пробирку со смесью из ванны.
5. Сделайте посевы на подходящую среду; инкубируйте.

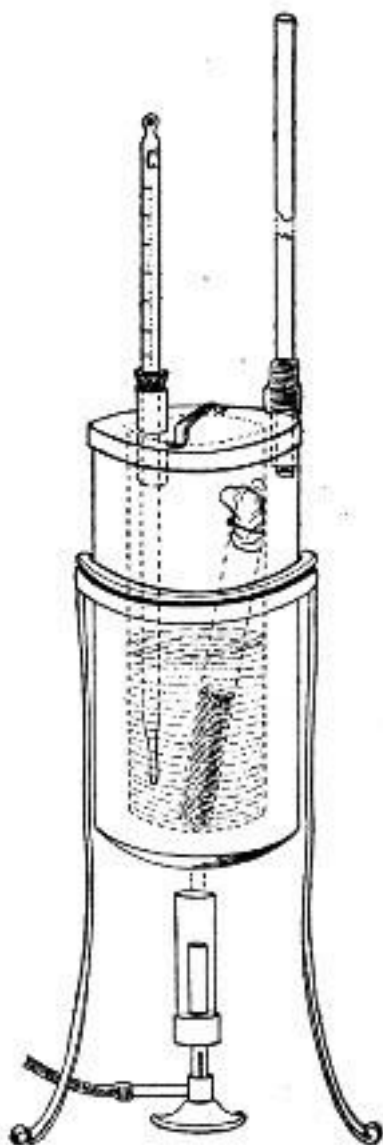


Рис. 140.—Бензольная ванна.

7. Дифференциальное культивирование атмосферы.—

(а) Адаптируя атмосферные условия к конкретному организму, который желательно изолировать, сравнительно легко отделить строгий аэроб от строгого анаэроба, и *наоборот*. В первом случае, однако, важно, чтобы культивирование производилось на твердой среде, поскольку при проведении в жидкой среде размножение аэробов в верхних слоях жидкости делает глубины полностью анаэробными, и в этих условиях рост анаэробов будет продолжаться бесконтрольно.

(b) Когда требуется отделить факультативный анаэроб от строгого анаэроба, обычно достаточно поместить смесь на агар с наклонной поверхностью, аэробно инкубировать при 37 ° С и тщательно проверять с частыми интервалами. При первых признаках роста подкормки должны быть подготовлены и обработаны аналогичным образом. В результате этих быстрых субкультур факультативный анаэроб будет сохранен в чистой культуре примерно в третьем или четвертом поколении.

(с) Если, с другой стороны, строгий анаэроб является организмом, которому требуется смесь факультативных и строгих анаэробов, залейте чашки глюкозоформиаггаром (или желатином) обычным способом, поместите их в банку Буллоха или Нови и инкубируйте при подходящей температуре. Отбирайте колонии нужного организма, когда появится рост, и переносите в пробирки с различными питательными средами.

Инкубировать при подходящих условиях температуры и атмосферы.

8. Прививка животным.—

Наконец, при работе с патогенными организмами часто рекомендуется привить часть загрязненной культуры (или даже часть исходного *материала morbi*) животному, специально выбранному из-за его восприимчивости к конкретному патогенному организму, который желательно привить. Действительно, для некоторых наиболее чувствительных и строго паразитических бактерий этот метод инокуляции животных является практически единственным методом, который дает удовлетворительный результат.

XVI. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ИССЛЕДОВАНИЯ.

Для идентификации организма после выделения необходимо подготовить пробирки, планшеты и другие образцы для культивирования, инкубировать при подходящих условиях температуры и окружающей среды и время от времени исследовать (а) , (b)микроскопическими методами, (в)химическими методами, (d)физическими методами, (е)методами инокуляции, **а также результаты этих исследований**должным образом зафиксировано.

Необходимо определенно заявить, что ни один микроорганизм не может быть идентифицирован по какому-либо *одному* признаку или свойству, будь то микроскопическое, биологическое или химическое, но, напротив, вся история его жизни должна быть тщательно изучена, а затем его идентичность установлена на основе рассмотрения общей суммы этих наблюдений.

Для придания зарегистрированным результатам максимальной ценности важно, чтобы они были точными и систематическими, поэтому следует придерживаться некоторой схемы, подобной следующей; и особенно это необходимо при описании организма, который ранее не выделялся и не изучался.

СХЕМА ОБУЧЕНИЯ.

Обозначение:

Первоначально выделен (именемнаблюдателя) в (дату), из (источника организма).....

1. Культурные признаки.—(Видео макроскопического исследования культуры, стр. 261.)

Желатиновые пластинки,	}
Желатиновые прожилки,	} при 20°C.
Желатиновые пластинки,	}
Желатиновую смесь взболтать,	}
Пластинки с агаром,	}
Полоски или мазок агара,	}
Кусочек агара,	}
Сгущенная сыворотка крови,	} при 20°C и 37°C.
Бульон,	}
Лакмусовая бумажка,	}
Картофель,	}

Специальные средства массовой информации с целью демонстрации характерной внешности.

2. Морфология.—(Видео микроскопического исследования культиваций, стр. 272.)

Вегетативные формы:

Форма.

Размер.

Подвижность.

Жгутики (при наличии).

Капсула (при наличии).

Формы инволюции.

Плеоморфизм (если наблюдается).

Споровые формы (если наблюдается). Из какого класса?

Реакции окрашивания.

3. Химические продукты роста.—(Видео химического исследования культур, стр. 276.)

Хромогенез.
Фотогенез.
Образование ферментов.
Ферментация углеводов:
Образование кислоты.
Образование щелочи.
Образование индола.
Образование фенола.
Восстанавливающие и окисляющие вещества.
Газообразование.

4. Биология.—(Видеозапись физического исследования культур, стр. 295.)

Атмосфера.
Температура.

Реакция питательных сред.
Устойчивость к смертельным агентам:
Физическая:
Обезвоживание.
Свет.
Цвета.
Химические бактерициды.
Жизнеспособность.

5. Патогенность:

Восприимчивые животные, расположенные в порядке восприимчивости.
Животные с иммунитетом.
Экспериментальная прививка, симптомы заболевания.
Посмертные проявления.
Вирулентность:
сохраняется в течение длительного времени.
Оптимальная среда?
Минимальная смертельная доза.
Повышение и ослабление вирулентности?
Образование токсина.

МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТИВАЦИЙ.

При описании видимого невооруженным глазом роста бактерий и при малом энергопотреблении следует использовать описательные термины, введенные Честером (и включенные в следующую схему).

Твердые носители.

Пластинчатые культуры.—

Желатин.—Обратите внимание на наличие или отсутствие разжижения окружающей среды. Если присутствует разжижение, обратите внимание на форму и характер (*смотрите* стр. 269, "колотые" культуры).

Агар.—В этой среде не происходит разжижения. Жидкость, находящаяся на поверхности агара (или на дне пробирки в пробирных культурах с агаром), представляет собой просто воду, которая отлила во время быстрого затвердевания среды и впоследствии сконденсировалась.

Желатин и агар.—Исследуйте колонии с интервалом в двадцать четыре часа.

а) невооруженным глазом.

(b) С помощью ручного объектива или стекла часового мастера.

(с) под микроскопом малой мощности (1 дюйм) или с помощью небольшого препарирующего микроскопа.

Отличайте поверхностные колонии от глубоких и обратите внимание на характер отдельных колоний.

(A) **Размер.**—Диаметр в миллиметрах для разных возрастов.

(B) **Форма.**—

Точечная форма: Размеры слишком малы, чтобы определить форму невооруженным глазом; мелкая, выпуклая, полусферическая.

Круглый: более или менее круглой формы.

Эллиптический: более или менее овальной формы.

Неправильный: очертания, не соответствующие какой-либо узнаваемой форме.

Веретенообразный: веретенообразный, сужающийся на каждом конце.

Улитка: спиральная или закрученная наподобие раковины улитки (рис. 141, а).

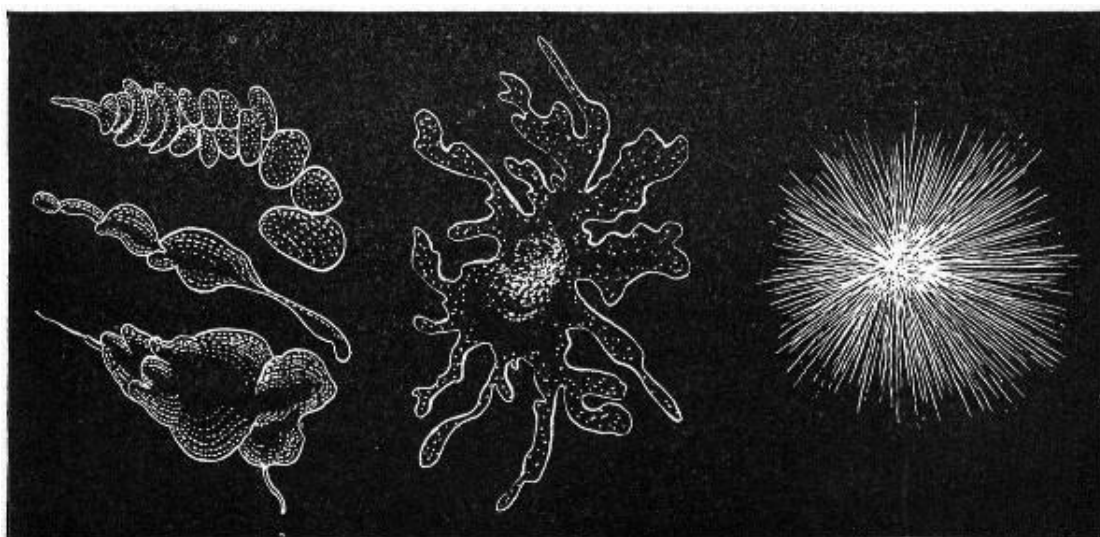


Рис. 141. Типы

колоний: а— улитковидные; б - амeboидные; в - мицелиоидные.

Амебоидный: Очень неправильной формы, струящийся (рис. 141, б).

Мицелиоид: Нитевидная колония, имеющая лучеобразный характер плесени (рис. 141, с).

Волокнистый: нерегулярная масса неплотно сплетенных нитей (рис. 142, а).

Хлопьевидный: плотной шерстистой структуры.

Ризоид: неправильной формы, разветвленный, похожий на корень (рис. 142, б).

Конгломерат: совокупность колоний одинакового размера и формы (рис. 142, в).

Торулоид: совокупность колоний, подобная почкованию дрожжевого растения (рис. 142, д).

Розеточный: По форме напоминает розетку.

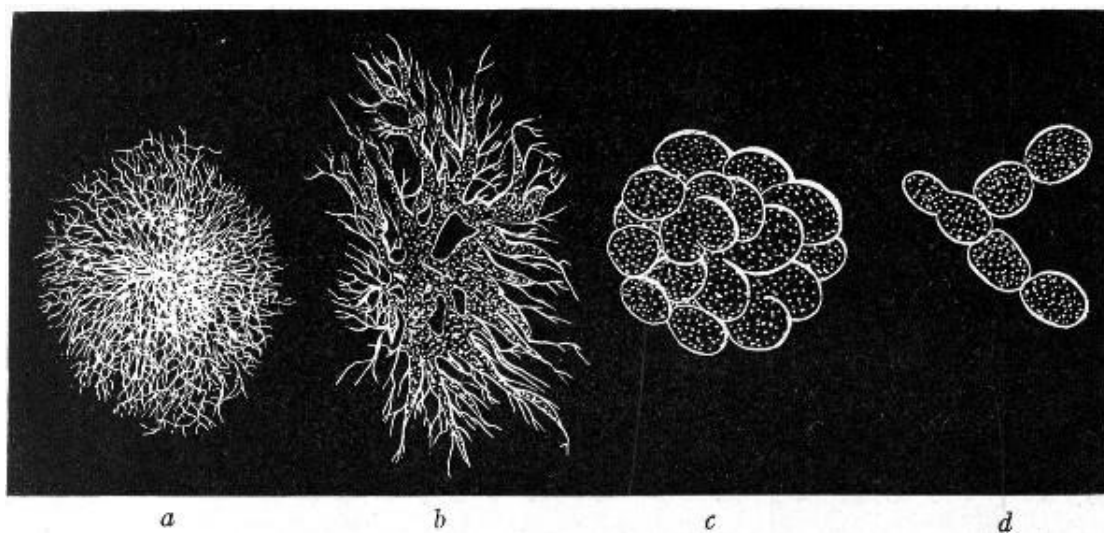


Рис. 142. Типы

колоний: а— нитевидные; б - ризоидные; в - конгломератные; г-торулоидные.

В) высота поверхности.—

1. Общий характер поверхности в целом:

Плоский: тонкий, покрытый листьями, стелющийся по поверхности (рис. 143, а).

Растекается: Распределяется по поверхности тонким слоем, более деликатным, чем предыдущий.

Приподнятый: Поросль густая, с крутыми террасовидными краями (рис. 143, б).

Выпуклый: поверхность напоминает сегмент круга, но очень плоско выпуклая (рис. 143, с).

Пульвинат: поверхность в виде сегмента круга, но явно выпуклая (рис. 143, d).

Головчатый: Поверхность полусферическая (рис. 143, е).

Пуповина: Имеющая центральную ямку или углубление (рис. 143, f).

Конический: Конус с закругленной вершиной (рис. 143, g).

Умбонат: Имеющий центральное выпуклое возвышение, похожее на сосок (рис. 143, h).

2. Подробные характеристики поверхности:

Гладкая: ровная поверхность без каких-либо из следующих отличительных признаков.

Альвеолярный: Отмечен углублениями, разделенными тонкими стенками, напоминающими пчелиные соты (рис. 144).

Пунктат: Усеян проколами, похожими на булавоочные уколы.

Выпуклая форма: поверхность похожа на волдырь, выступающий выпуклыми выступами, довольно грубая.

Везикулярный: более или менее покрыт мелкими пузырьками из-за газообразования; более мелкий, чем буллезный.

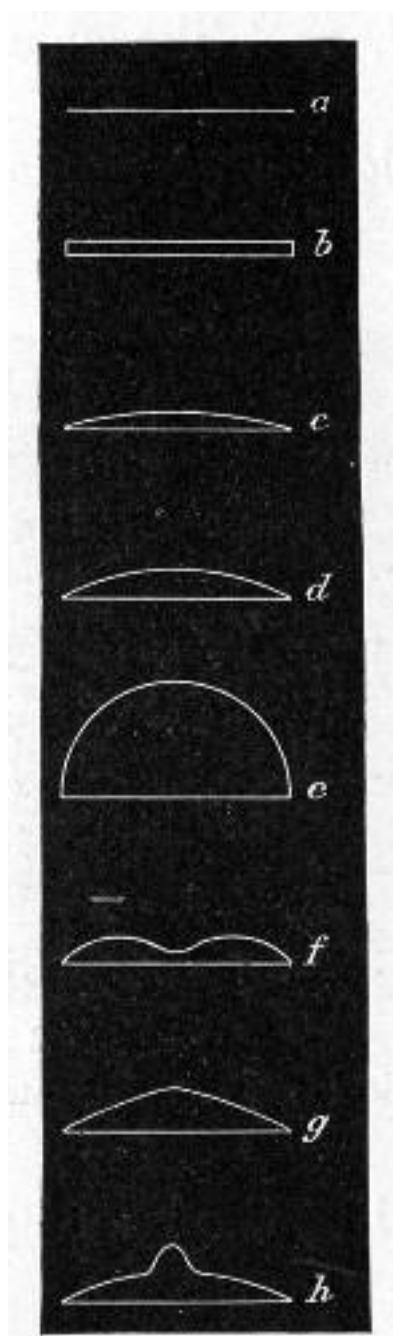


Рис. 143. Рельеф поверхности колоний: а — плоский; b - приподнятый; c - выпуклый; d - пульвинатный; e- головчатый; f - умбиликатный; g - конический; h - умбонизированный.

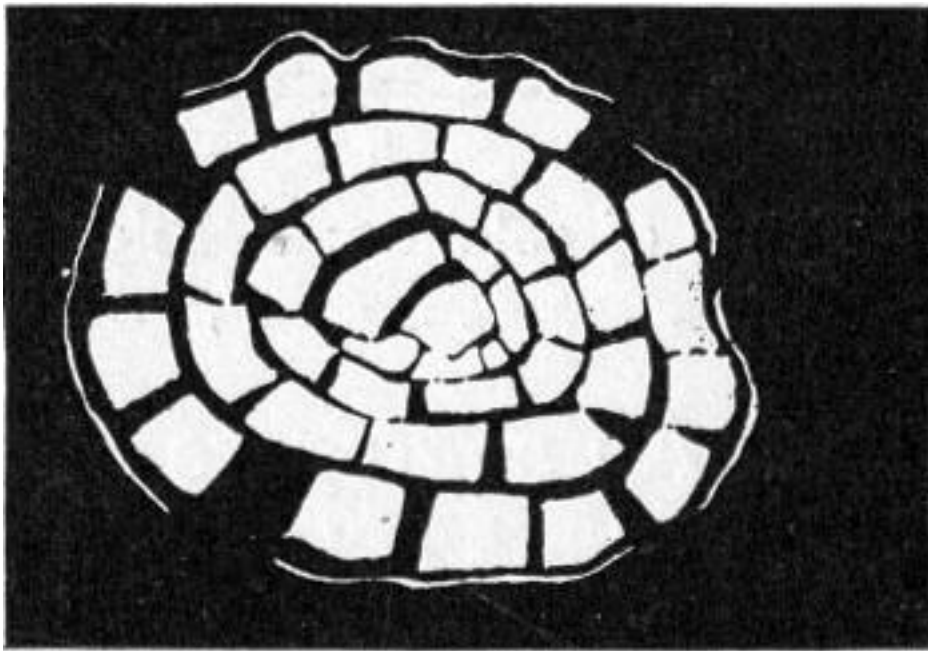


Рис. 144.—Типы колоний—

альвеолярные.

Веррукоза: Бородавкообразная, с бородавкообразными выступами.

Чешуйчатый: Чешуйчатый, покрытый чешуйками.

Эхинацея: Окружена заостренными выступами.

Сосочковидный: окружен сосками или маммоподобными отростками.

Морщинистость: короткие неправильные складки из-за уменьшения поверхностного роста.

Гофрированный: образуется длинными складками из-за усадки.

Очерченная: неровная, но плавно волнистая поверхность, напоминающая поверхность рельефной карты.

Римоз: Изобилует щелями или разломами.

(D) Внутреннее строение колонии (Микроскопическое).—

Рефракция слабая: Контур и рельефная поверхность не очень четко очерчены.

Сильная рефракция: Контур и рельефная поверхность четко очерчены; плотные, не нитевидные колонии.

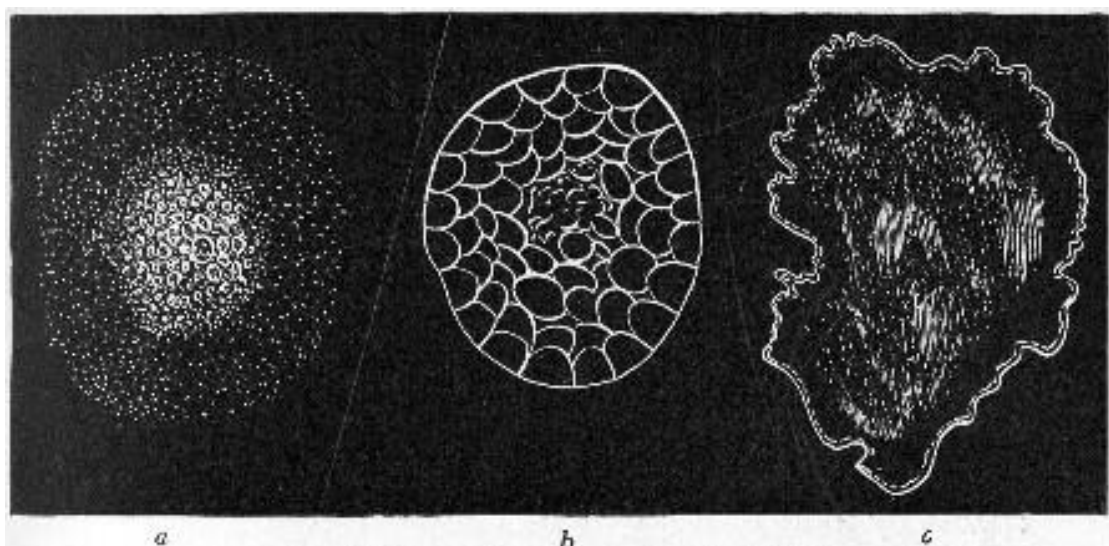


Рис. 145. Типы

колоний: а, грумозные; б, морулоидные; в, мутные.

1. Общие:

Аморфный: Без какой-либо определенной структуры, такой, как указано ниже.

Гиалин: Прозрачный и бесцветный.

Однородный: Структура однородна во всех частях колонии.

Гомохромный: цвет равномерный по всей длине.

2. Грануляции или Вкрапления:

Мелкозернистый.

Крупнозернистый.

Грумозный: Более грубый, чем предыдущий, со свернувшимся видом и частицами в виде сгруппированных зерен (рис. 145, а).

Морулоидный: Имеющий характер шелковицы, сегментированный, с помощью которого колония разделена на более или менее правильные сегменты (рис. 145, б).

Мутный: Имеет бледную основу с плохо очерченными участками более глубокого оттенка (рис. 145, в).

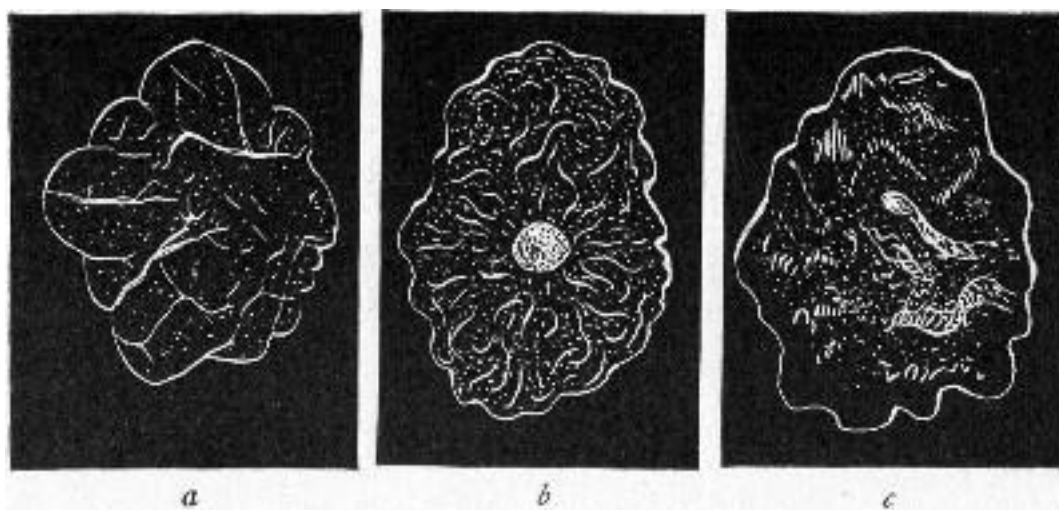


Рис. 146. Типы

колоний: а, сетчатые; б, гирозные; в, мраморные.

3. Маркировка или чередование колоний:

Сетчатый: В виде сети, похожей на прожилки листа (рис. 146, а).

Ареолятный: Разделен на довольно неправильные или угловатые пространства более или менее определенными границами.

Гироз: Отмечен волнистыми линиями, расположен неограниченно (рис. 146, б).

Мраморный: со слабыми, неправильными полосами или с прожилками, как на мраморе (рис. 146, в).

Река: отмечена линиями, похожими на реки на карте.

Римоз: Видны щели или выбоины.

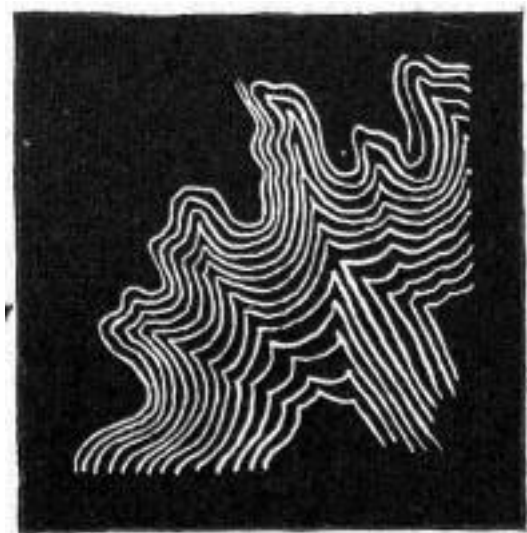


Рис. 147. Типы колоний—свернутые.

4. Нитевидные колонии:

Нитевидный: Как уже определено.

Хлопьевидный: Состоит из плотно расположенных нитей.

Скрученный: Нити собраны в параллельные пряди, похожие на локоны (рис. 147).

(Е) Края колоний.—

Целиком: Без зазубрин или делений (рис. 148, а).

Волнистый: волнистый (рис. 148, б).

Повторение: Похоже на кайму раскрытого зонтика (рис. 148, в).

Эрозия: Как будто обглоданная, с неправильными зубьями (рис. 148, d).

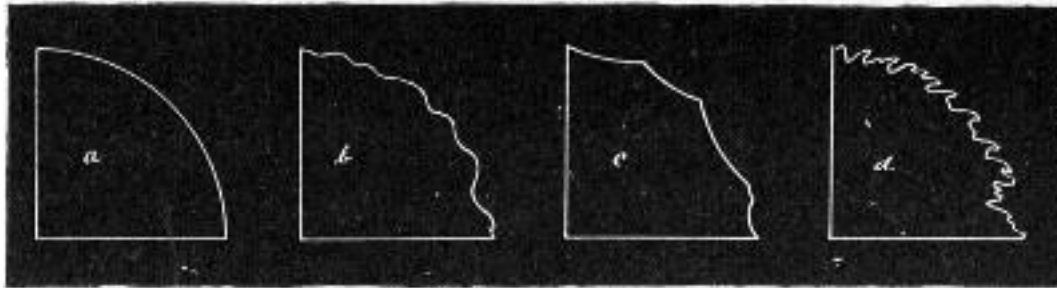


Рис. 148.Края

колоний: а — цельные; b - волнистые; c - повторные; d- эрозивные.

Лопастная.

Лопастные: Мелко-лопастные (рис. 149, e).

Ушная раковина: С мочками, похожими на уши (рис. 149, f).

Рваная рана: неправильной формы, как будто разорванная (рис. 149, g).

Отростки: с бахромой (рис. 149, h).

Инфузории: отростки, похожие на волосы, расположенные радиально (рис. 149, j).

С хохолком.

Нитевидный: Как уже определено.

Свернутый: Как уже определено.



Рис. 149. Края

колоний: e, дольчато—лопастные; f, ушные; g, рваные; h, фимбриатные; i, инфузориатные.

(F) Оптические символы (в честь Шаттлуорта).—

1. Общие характеристики:

Прозрачный: пропускающий свет.

Стекловидное тело: прозрачное и бесцветное.

Маслянистый: прозрачный и желтый; от оливкового до льняного цвета.

Смолистый: Прозрачный и коричневый, цвета лака или смолы.

Полупрозрачный: Слегка прозрачный.

Фарфоровая кожа: Полупрозрачная и белая.

Опалесцирующий: полупрозрачный; серовато-белый в отраженном свете.

Перламутровый: полупрозрачный, серовато-белый, с жемчужным блеском.

Сальные железы: Полупрозрачные, желтоватые или серовато-белые.

Маслянистый: Прозрачный и желтый.

Керамические: Полупрозрачные, воскового цвета.

Непрозрачный.

Меловой период: Непрозрачный и белый, меловой.

Тусклый: Без блеска.

Блестящий: Сияющий.

флуоресцентный.

Переливающийся.

2. Хромогенность:

Цвет пигмента.

Пигмент, ограниченный колониями.

Пигмент ограничен средой, окружающей колонии.

Пигмент, присутствующий в колониях и в среде.

Штриховать или мазать культуры.—

Желатин и агар.—Обратите внимание на общие моменты, указанные в разделе "Культивирование на пластинах".

Сжиженная кровь-сыворотка.—Обратите внимание на наличие или отсутствие разжижения среды. (Наличие конденсата на дне трубки не следует путать с разжижением среды.)

Все культуры из наклонных трубок.—

1. Отдельные колонии: размер, форма и т.д., как при выращивании на пластинках (*смотрите* стр. 261).

2. Слияние колоний: высота поверхности и характер края, как при культивировании на пластинках (видео, стр. 263).

Хромогенность: Как для пластинчатых культур.

Колотые культуры желатина.—

(А) *Поверхностный рост.*— Как для отдельных колоний в пластинчатых культурах (вид стр. 261).

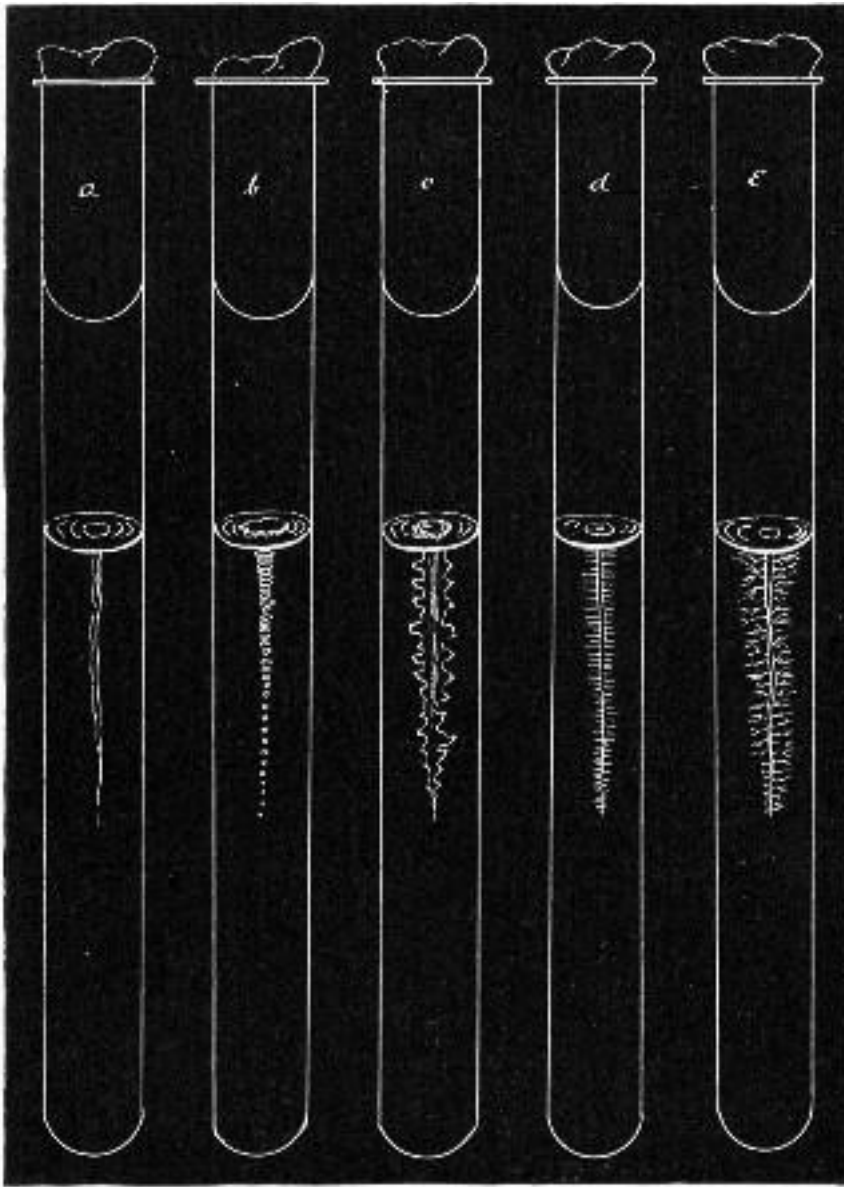


Рис. 150. Черенковые культуры—

типы роста: а нитевидный; б бисерный; с игловидный; d ворсинчатый; е древовидный.

(В) *Линия прокола.*—

Нитевидный: равномерный рост, без особых примет (рис. 150, а).

Узловатый: Состоит из тесно агрегированных колоний.

Бисеринки: Состоящие из неплотно расположенных или разрозненных колоний (рис. 150, б).

Сосочек: Изобилует отростками сосочков.

Эхинация: окружена игольчатыми отростками (рис. 150, в).

Ворсинки: Окружены короткими, неразделенными, похожими на волосы отростками (рис. 150, d).

Перистый: Нежный пушистый нарост.

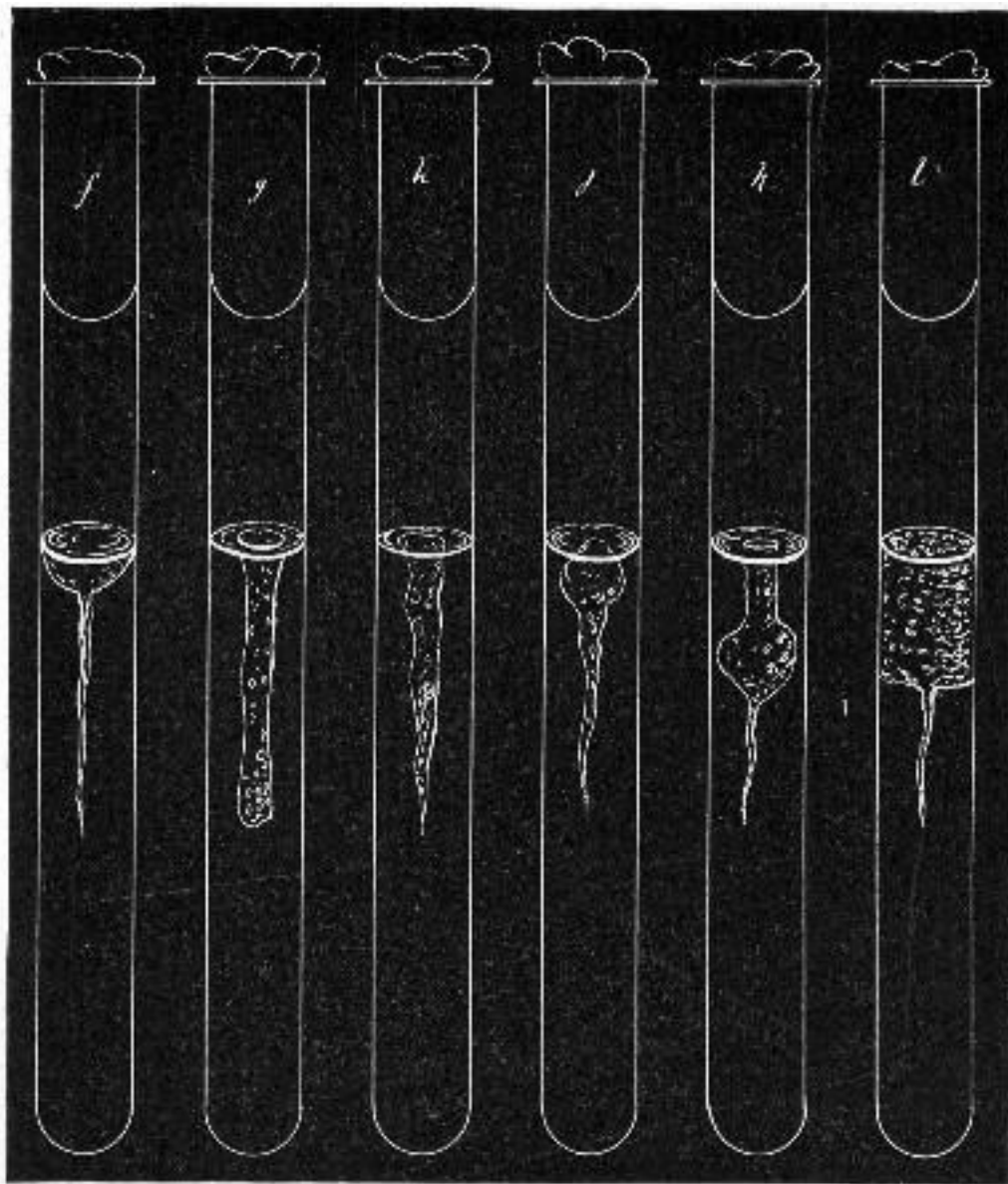


Рис. 151. палочковидные

культуры—типы роста: f, кратерообразный; g, мешковидный; h, воронкообразный; j, ворсообразный; k, веретенообразный; l, слоевидный.

Древовидный: Разветвленный или древовидный, окруженный разветвленными отростками, похожими на волосы (рис. 150, e).

(С) Зона сжижения (при наличии).—

Кратерообразный: разжижение желатина в форме блюдца (рис. 151, f).

Мешочек: Форма удлиненного мешка, цилиндрическая труба (рис. 151, g).

Инфундибулиформ: Форма воронки, коническая (рис. 151, h).

Напиформ: форма репы (рис. 151, j).

Веретенообразная: очертания пастернака, узкие с обоих концов, наиболее широкие под поверхностью (рис. 151, к).

Слоистая форма: разжижение, распространяющееся к стенкам трубки и вниз по горизонтали (рис. 151, l).

(D) Характер разжиженного желатина.—

1. Пленка на поверхности.
2. Равномерно мутный.
3. Гранулированный.
4. В основном прозрачный, но содержащий хлопья.
5. Нанесите на верхушку сжиженной порции.

(E) Образование пузырьков газа.

Встряхните культуры.—

1. Наличие или отсутствие разжижения.
2. Образование пузырьков газа.
3. Основная часть роста на поверхности —аэробная.
4. Основная масса растений на глубине —анаэробные.

Текущие среды.

1. Поверхность жидкости.—

Наличие или отсутствие пены из-за пузырьков газа.

Наличие или отсутствие пленкообразования.

Характер пленки.

2. Жидкая масса.—

Равномерно мутный.

Хлопья во взвешенном состоянии.

Гранулы во взвешенном состоянии.

Прозрачный, с осадком на дне пробирки.

Окраска жидкости, наличие или отсутствие.

3. Выпадать в осадок.—

Характер.

Сумма.

Цвет.

Углеводная среда.—

Рост.

Реакция.

Газообразование.

Свертывание или нет сывороточного белка (при использовании водной среды сыворотки).

Выращивание лакмусового молока.—

- | | |
|----------------------|---|
| | {Без изменений. |
| 1. Реакция: | {Кислота. |
| | {Щелочной. |
| 2. Запах. | |
| 3. Образование газа. | {Без изменений. |
| 4. Консистенция: | {Пептонизированный (характер раствора). |
| | {Свернувшийся. |
| | {твердый: solid. |
| 5. Сгусток: Характер | {мягкий: хлопьевидный. |
| | {рванный и разорванный пузырьками газа. |

(a) Коагулят нерастворенный.

(b) Коагулят окончательно пептонизирован, полностью: неполно.

Полученный раствор прозрачный: мутный.

- | | |
|---------------|--------------------------------------|
| | {Обильный. |
| | {Скудный. |
| 6. Сыворотка: | {Прозрачная. |
| | {Мутная. |
| | {Свертывается при кипячении или нет. |

МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ.

В качестве рекомендации по совершенствованию препараты должны производиться из чистых культур 4, 6, 8, 12, 18, в течение 24 часов; и впоследствии с интервалом, скажем, в двадцать четыре часа, в течение всего периода они находятся под наблюдением и исследуются -

(А) Живой.-1. При **подвешивании капли** для определения *подвижности* или *неподвижности*.

В этой связи следует помнить, что при определенных условиях окружающей среды (например, при исследовании в неподходящей среде, атмосфере, температуре и т.д.) подвижные бациллы могут не проявлять активности. Следовательно, ни один организм не должен быть зарегистрирован как неподвижный только на основании одного наблюдения; серия наблюдений в разном возрасте и при различных условиях должна составлять основу для заключения об отсутствии истинной локомоции.

Размер.— В случае неподвижных или вяло подвижных организмов постарайтесь измерить несколько особей в каждой висящей капле с помощью окулярного микрометра или эйконометра (см. стр. 63) и усредните результаты.

Если организм образует споры, обратите внимание —

(а) Спорообразование.—Приготовьте культивирование в виде висячих капель (*видео*, стр. 78) вегетативных форм организма, добавив в каплю на кончике платиновой иглы каплю пурпурного раствора (0,5%) или другого внутривенного красителя (см. стр. 77), чтобы облегчить наблюдение за феноменом, сделав бациллы более отчетливыми.

Поместите препарат на подставку микроскопа; при необходимости используйте подогретую подставку.

Организуйте освещение и т.д. и выберите одиночную бациллу для наблюдения с помощью объектива 1/6 дюйма.

Замените шестую иммерсионную линзу диаметром 1/12 дюйма и понаблюдайте за образованием спор; если возможно, измерьте любое изменение размера, которое может произойти, с помощью микрометра Рамсдена.

(b) Прораствание спор.—Приготовьте висячие культуры из старых культур, в которых нет живых вегетативных форм, и аналогичным образом наблюдайте за процессом прораствания.

Комфорт микроскописта в значительной степени повышается в тех случаях, когда период наблюдения вообще длительный, за счет использования какой-либо формы глазного экрана перед незанятым глазом, например, изображенного на стр. 58 (рис. 49).

Если невозможно выполнить предложенный выше метод, действуйте следующим образом:

(а) Спорообразование.—Посадите организм в бульон и инкубируйте в оптимальных условиях.

Через равные промежутки времени, скажем, каждые тридцать минут, снимайте петлю с культивации и готовьте укрывную пленку.

Зафиксируйте, пока еще влажно, в едком сублиматном фиксирующем растворе.

Окрашивают анилиновой горечавкой фиолетовой и частично обесцвечивают 2%-ной. уксусной кислотой.

Установите и пронумеруйте последовательно; затем осмотрите.

(b) *Прораствание спор.*— Выдержите густую эмульсию спор при температуре 80°C в течение десяти минут в дифференциальном стерилизаторе (вид стр. 257).

Перелейте эмульсию в пробирку со стерильным питательным бульоном и инкубируйте.

Извлекайте образцы из пробирки для культивирования с интервалом, скажем, в пять минут.

Закрепите, испачкайте и т.д., намочите, как показано ниже (a), и осмотрите.

(В) Исправлено.-2. В окрашенных препаратах.

(a) Для определения точек в *морфологии*:

Форма (смотрите классификацию, стр. 131).

Размер:

(a) Приготовьте заготовки для защитной пленки разного возраста и закрепите, выдержав при температуре 115 ° C в течение двадцати минут в духовке с горячим воздухом.

(b) Окрашивают препараты по методу Грамма (если применимо) или разбавленным карболфуксином и монтируют обычным способом.

(c) Измерьте (видео стр. 66) примерно двадцать пять особей на каждой пленке с помощью микрометра Ramsden's или stage и усредните результат.

Плеоморфизм; Если отмечено, запишите—

Преобладающий характер вариантных форм.

На каком носителе или средах они наблюдаются.

На каком этапе развития.

(b) Для демонстрации деталей *структуры*:

Жгутики: Если отмечены, запишите—

Способ окрашивания (видео на странице 101).

Положение и компоновка (видео, стр. 136).

Количество.

Споры: При обнаружении записать—

Способ окрашивания.

Форма.

Размер.

Положение внутри родительской ячейки.

Состояние родительской ячейки в отношении формы (*смотрите* на странице 139).
Оптимальная среда и температура.
Возраст выращивания.
Условия окружающей среды в отношении температуры, атмосферы.
Способ проращивания (*смотрите* на странице 140).

Формы инволюции: Если отмечено, запишите—

Способ окрашивания.
Характер (*например*, живой или мертвый).
Форма.
На каком носителе они наблюдаются.
Возраст носителя.
Окружающая среда.

Метахроматические гранулы: Если заметили, запишите—

Способ окрашивания.
Характер гранул.
Количество гранул.
Цвет гранул.

3. Реакции окрашивания.—

1. *Метод Грэма.*—Положительный или отрицательный.

2. *Метод Нейссера.*—Если отмечены гранулы, запишите—

1. Должность.
2. Номер.

3. *Метод Зилья-Нельсена.*— Быстро сохнет или обесцвечивается.

4. *Простые анилиновые красители.*— (Отмечая те, которые дают наилучшие результаты, с подробностями процессов окрашивания.)

Метиленовый синий }
Фуксин } и их модификации.
Горечавка фиолетовая }
Тиониновый синий }

БИОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ.

Тестовые культивирования организма на наличие...

Растворимые ферменты —протеолитические, диастатические, инвертаза.

Органические кислоты —(а) количественно —*т.е.* оцените общее образование кислот; (b) качественно для муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной, молочной.

нашатырный спирт.

Нейтральные летучие вещества —этиловый спирт, альдегид, ацетон.

Ароматические продукты —индол, фенол.

Растворимые пигменты.

Проверьте способность превращать (а) красящие вещества, (б) нитраты в нитриты.

Исследуйте добычу газа — H_2S , CO_2 , H_2 . Оцените соотношение между двумя последними газами.

Подготовьте все культуры для этих методов исследования в *оптимальных* условиях, предварительно определенных для каждого из организмов, которые предполагается исследовать, чтобы

(а) Реакция среды;

(b) Температура инкубации;

(с) Атмосферная среда;

и ведите тщательный учет этих баллов, а также возраста культивирования, используемого при окончательном экзамене.

Исследуйте культуры на наличие различных продуктов бактериального метаболизма после сорока восьми часов роста и **никогда не забывайте проверять "контрольную" (незасеянную) пробирку или колбу со средой из той же партии, выдержанные в течение аналогичного периода в идентичных условиях.**

Если результаты отрицательные, протестируйте дальнейшие культивации через три, пять и десять дней.

1. Выработка ферментов.—

(А) *протеолитические ферменты.*— (Превращают белки в протеозу, пептон и другие продукты гидролиза; например, *B. ruosyaneus*.)

Требуемые носители:

Сыворотка крови и молочная сыворотка, тщательно отфильтрованные через фарфоровую свечу.

Требуемые реагенты:

Сульфат аммония.

тридцатипроцентный. раствор каустической соды.

Сульфат меди 0,5%. водный раствор.

Однопроцентный. раствор уксусной кислоты.

Реагент Миллона.

Раствор глиоксиловой кислоты.
Концентрированная серная кислота.

Способ.—

1. Подготовьте культуры навалом (50 °с) в колбе и инкубируйте.
2. Слегка подкислите жидкость уксусной кислотой, затем прокипятите. (При этом неизмененные белки выпадают в осадок.)
3. Фильтр.
4. Наберите 10 г фильтрата в пробирку и добавьте 1 г каустической соды, затем каплю за каплей добавьте медный купорос.

Розовый цвет, который становится фиолетовым при добавлении большего количества сульфата меди = протеоза и пептон.

5. Пропитайте оставшийся фильтрат сульфатом аммония.

Осадок = протеоза.

6. Отфильтруйте и разделите фильтрат на три части *a*, *b* и *c*.

a. Повторите тест с сульфатом меди, используя избыток каустической соды для вытеснения аммиака из сульфата аммония.

Розовый цвет = пептон.

- b*. Прокипятите с реактивом Миллона.

Красный цвет = тирозин.

- c*. Добавьте раствор глиоксиловой кислоты и прогоните в концентрированной серной кислоте.

Фиолетовое кольцо при верхнем уровне кислоты = триптофан.

И тирозин, и триптофан могут находиться либо в свободном состоянии, либо в комбинации в виде полипептида или пептона.

(*B*) *Диастаза*.—(Превращает крахмал в сахар; *например*, *B. subtilis*.)

Требуемая среда:

Бульон без добавок.

Требуемые реагенты:

Крахмал.

Тимол.

Раствор Фелинга.

Способ.—

1. Подготовьте пробирное культивирование и инкубируйте.
2. Приготовьте тонкую крахмальную пасту и добавьте в нее 2% тимол.
3. Смешайте равные части тестируемого культивирования и крахмальной пасты и поместите в инкубатор при температуре 37° С на шесть-восемь часов.
4. Фильтр.

Проверьте фильтрат на наличие сахара.

Вскипятите немного раствора Фелинга в пробирке.

Добавляйте фильтрат по капле до тех пор, пока, при необходимости, не будет добавлено количество, равное количеству используемого раствора Фелинга, поддерживая температуру кипения смеси в течение всего процесса.

Желтый или оранжевый осадок = сахар.

(С) *Инвертаза*.— (Превращает сахарозу в смесь декстрозы и левулозы, например, *B. fluorescens liquifaciens*.)

Требуется среда:

Бульон без добавок.

Необходимые реагенты:

Тростниковый сахар, 2%. водный раствор.

Карболовая кислота.

Способ.—

1. Подготовьте образцы для культивирования в пробирках и инкубируйте.
2. Добавьте 2% карболовой кислоты в раствор сахара.
3. Смешайте равные количества раствора карболизированного сахара и разведения в пробирке; дайте смеси настояться в течение нескольких часов.
4. Фильтр.

Проверьте фильтрат на снижение содержания сахара, как описано в предыдущем разделе.

(D) *Ренин и "Лабораторные" ферменты*.— (Свертывают молоко независимо от действия кислот; например, *B. prodigiosus*.)

Необходимый наполнитель:

Бульон без инозитов.

Лакмусовое молоко.

Способ.—

1. Подготовьте образцы для культивирования в пробирках и инкубируйте.
2. После инкубации нагревайте культивирование до 55 ° С в течение полчаса для стерилизации.
3. С помощью стерильной пипетки влейте по 5 мл препарата в каждую из трех пробирок с лакмусовым молочком.
4. Поместите в холодный инкубатор при температуре 22 ° С. и проверяйте каждый день в течение десяти дней.

Отсутствие коагуляции в конце этого периода будет указывать на отсутствие образования сычужного фермента.

Реакции брожения.

Проверено на содержание углеводов и органических солей.

Требуемые носители информации:

Пептоновая вода, содержащая различные процентные содержания (обычно 2%) каждого из веществ, указанных в разделе "сахарная" среда (стр. 177), а также пробирки с пептоновой водой, содержащие 1%. соответственно каждого из следующих:

Органические соли: Цитрат натрия, формиат, лактат, малат, тартрат.

Способ.—

1. Подготовьте пробирки для культивирования в каждой из вышеперечисленных сред.
2. При необходимости наблюдайте изо дня в день до истечения десяти дней.
3. Обратите внимание на рост, реакцию, выделение газа.
2. Производство кислоты.

(а) *Количественный.*—

Требуемая среда:

Бульон с сахаром (глюкозой) известной "оптимальной" реакции.

Необходимое оборудование и реагенты:

Что касается оценки реакции среды (видео, стр. 150).

Способ.—

1. Приготовьте культивирование навалом (100 °с) в колбе; также "контрольную" колбу со средой из той же партии.

2. После соответствующей инкубации нагревайте обе колбы в пароварке при температуре 100 °С в течение тридцати минут для стерилизации.

3. Определите *титр* среды в "инокулированных" и "контрольных" колбах, как описано в разделе "Приготовление питательных сред" (*видео*, стр. 151).

4. Разница между титрами среды в двух колбах дает общую выработку кислоты наблюдаемой бактерией в пересчете на нормальный NaOH.

Примечание.—При очень интенсивном росте может быть сложно определить конечную точку. Затем культивирование следует отфильтровать через фильтр-свечу Беркефельда перед этапом 2, а фильтрат использовать для титрования.

(b) *Качественный* (из всех присутствующих органических кислот).—

Требуемая среда:

Бульон с сахаром (глюкозой или лактозой), указанный при количественном анализе.

Необходимые реагенты:

Соляная кислота концентрированная.

Соляная кислота 25%.

Серная кислота концентрированная (чистая).

Фосфорная кислота, концентрированный раствор.

Аммиак.

Сульфат аммония.

Баритовая вода.

Карбонат натрия, насыщенный водный раствор.

Абсолютный спирт.

Эфир.

Хлорид кальция.

Раствор хлорида кальция.

Карбонат цинка.

Насыщенный водный раствор сульфата меди.

Спиртовой раствор тиюфена (0,15°С на 100 °С).

Древесный уголь животного происхождения.

Пятипроцентный. раствор нитропруссиды натрия.

Бихромат калия.

Реактив Шиффа.

Оксид мышьяка.

Хлорид железа, 4%. водный раствор.

Нитрат серебра, 1%. водный раствор.

Йод Люголя.

Десять процентов. раствор каустической соды.

Твердый парафин (температура плавления около 52°С).

Способ.—

1. Приготовьте культивирование навалом (500 °с) в литровой колбе и добавьте стерилизованный осажденный мел (10 г). Инкубируйте при оптимальной температуре.

2. После инкубации бросьте в культиватор кусочек парафина (примерно сантиметровый кубик) и соедините колбу с конденсатором.

Парафин, который разжижается и образует тонкий слой на поверхности жидкости, необходим для предотвращения образования пены и прохождения через конденсатор в неизменном виде в ходе последующего процесса дистилляции.

3. Перегоняйте при температуре от 200 до 300 °с.

Используйте конфорку с розовым верхом, чтобы свести к минимуму опасность растрескивания колбы; и с той же целью хорошо перемешайте содержимое колбы, чтобы предотвратить оседание мела.

Дистиллят "**A**" будет содержать спирт и т.д. (*видео*, стр. 285); остаток "**a**" будет содержать летучие и фиксированные кислоты.

4. Отсоедините колбу и фильтр. Остаток "**a**" тогда = фильтрат **B** и остаток **b**.

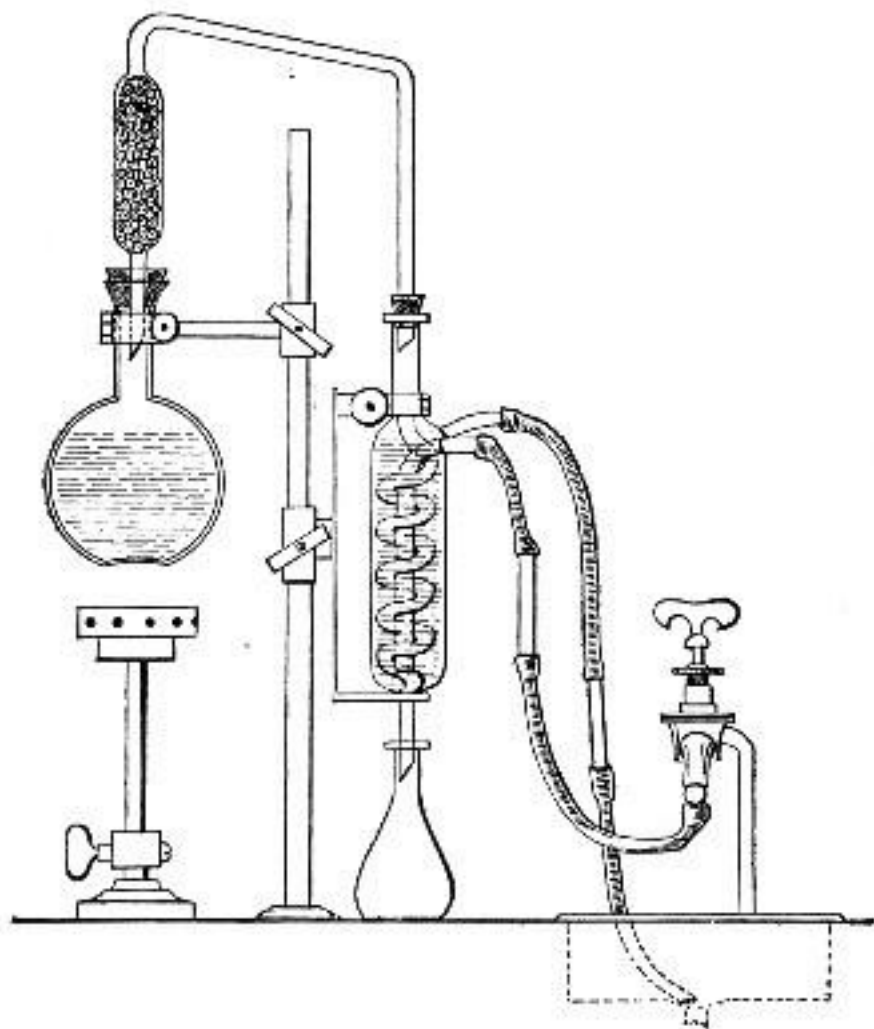


Рис. 152. Устройство

аппарата для перегонки кислот и т.п.

5. Осадок **б**. Смойте осадок с фильтровальной бумаги, растворите при нагревании разбавленной соляной кислотой и добавьте раствор хлорида кальция и аммиака до щелочного состояния.

Белый осадок, нерастворимый в уксусной кислоте = щавелевой кислоте.

6. Доведите фильтрат **В** до 500°с дистиллированной водой и разделите на две части.

7. Подкислите 250 °с 20-градусной концентрированной фосфорной кислотой (при этом высвобождаются летучие кислоты) и дистиллируйте до получения небольшого объема.

Дистиллят "В" может содержать муравьиную, уксусную, пропионовую, масляную и бензойную кислоты.

ДИСТИЛЛЯТ "Б"
(Летучие кислоты.)

↓
↓

отличить от масляной кислоты (с) Выпарить досуха; смешать кислоту с помощью тестов в равных количествах в рамках бактериологической

лаборатории по производству оксида мышьяка и нагреванию.

на платиновой фольге.

Неприятный **запах какодила** = уксусной кислоты.

(d) Добавьте несколько капель раствора хлорида ртути в пробирку и нагрейте до 70 °C.

Осадок хлорида ртути, который медленно восстанавливается до ртути = муравьиной кислоте.

8. Если дистилляцию "В" продолжать до тех пор, пока не появится кислота (время от времени в дистиллирующую колбу добавляют дистиллированную воду), дистиллят можно отмерить и использовать 50 °C для титрования. Это увеличит количество образующихся летучих кислот.

9. Вторую часть фильтрата "В" (см. стр. 282) следует исследовать на наличие молочной, щавелевой, янтарной, бензойной, салициловой, галловой и дубильной кислот следующим образом:

Растворимые в эфире кислоты.—

1. Выпарить до получения жидкого сиропа, сильно подкислить фосфорной кислотой.
2. Извлеките эфир, в пять раз превышающий его объем, путем перемешивания в разделительной воронке.
3. Выпарите эфирный экстракт до получения жидкого сиропа.
4. Добавьте 100 г воды и тщательно перемешайте.
5. К небольшой порции этого раствора добавьте небольшой избыток карбоната натрия, выпарьте досуха на водяной бане, растворите в чистой серной кислоте 5-10°C, добавьте 2 капли насыщенного раствора медного купороса, поместите в пробирку и нагревайте на кипящей водяной бане в течение 2 минут, остудите, добавьте 2-3 капли тиюфенового спирта и слегка подогрейте.

Вишнево-красный цвет = молочная кислота.

Если при добавлении серной кислоты образуется коричневый цвет, следует взять еще одну пробу и прокипятить с древесным углем животного происхождения перед выпариванием.

6. Если молочная кислота определенно присутствует, приготовьте лактат цинка путем кипячения части раствора эфирного экстракта с избытком карбоната цинка, фильтрации и упаривания

до кристаллизации. Полученные таким образом кристаллы имеют характерную форму и при сушке при 110°C должны содержать 26,87% цинка.

7. Проверьте часть оставшегося раствора эфирного экстракта на наличие щавелевой кислоты (стр. 282, этап 5). Тщательно нейтрализуйте остаток и добавьте раствор хлорида железа.

Красно-коричневый желатиновый осадок = янтарная кислота.

Желтоватый осадок = бензойная кислота и другие кислоты, родственные бензойной кислоте.

Фиолетовый цвет = салициловая кислота.

Чернильно-черный цвет или осадок = галловая или дубильная кислота.

Для дальнейшей идентификации следует определить температуру плавления кристаллических кислот и процентное содержание серебра в их солях серебра.

3. Производство аммиака.—

Требуемая среда:

питательный бульон.

Требуется реагент:

Реагент Нesslerа.

Способ.—

1. Приготовьте культивирование навалом (при температуре 100 °C) в колбе с температурой 250 °C и инкубируйте вместе с контрольной колбой.

Проверьте культивирование и контроль на содержание аммиака следующим образом:

2. В каждую колбу добавьте по 2 грамма прокаленной магнезии, затем соедините с помощью конденсатора и дистиллируйте.

3. Соберите по 50 г дистиллята от каждого из них в стакан Нesslerа.

4. Чистой пипеткой добавьте по 1 ч.л. реактива Нesslerа в каждый стакан.

Желтый цвет = аммиак.

Глубина цвета пропорциональна количеству присутствующего вещества.

4. Производство алкоголя и т.п.—Разделите дистиллят "А", полученный в ходе предыдущего эксперимента (*видео*, стр. 282, шаг 3), на четыре порции и проверьте на образование спирта, ацетальдегида, ацетона.

1. Добавьте йод Люголя, затем немного раствора NaOH и перемешивайте стеклянной палочкой, пока цвет йода не исчезнет.

Бледно-желтый кристаллический осадок йодоформа с характерным запахом, появляющийся на морозе, указывает на ацетальдегид или ацетон; появляющийся только при нагревании указывает на алкоголь.

Осадок может отсутствовать даже при ярко выраженном запахе.

2. Добавьте реактив Шиффа.

Фиолетовый или красный цвет = альдегид.

3. К 10°с раствора добавьте 2,5°с, то есть 25%. серную кислоту, один-два кристалла бихромата калия и дистиллировать. Восстановление бихромата до зеленого цвета и получение дистиллята с запахом ацетальдегида, который вступает в реакцию с реактивом Шиффа, указывает на присутствие спирта в исходной жидкости.

4. Добавьте несколько капель раствора нитропрусида натрия, сделайте щелочь аммиаком, затем насытите кристаллами сульфата аммония. Ацетон слабо окрашивается при добавлении аммиака, но после добавления сульфата аммония приобретает насыщенный перманганатный цвет, для достижения полной интенсивности которого требуется десять минут. Альдегид придает карминово-красный цвет, не измененный сульфатом аммония.

5. Производство индола.—

Требуемые носители:

Бульон без добавок (*видео*, стр. 183).

Или пептоновая вода (*смотрите* страницу 177).

Требуемые реагенты:

Персульфат калия, насыщенный водный раствор.

Раствор парадиметиламинобензальдегида. Его готовят путем смешивания:

Парадиметиламинобензальдегид 4 грамма

Абсолютный спирт 380 °с

Соляная кислота концентрированная 80°с

Способ.—

Подготовьте несколько образцов исследуемого организма в пробирке и инкубируйте.

Тестируют на наличие индола с помощью реакции Розиндола следующим образом. (Если культура инкубировалась при 37°С, перед проведением теста ей необходимо дать остыть до комнатной температуры.)

1. Удалите 2 ч.л. препарата для культивирования с помощью стерильной пипетки и перенесите в чистую пробирку, затем,

2. Добавьте 2 ст.л. раствора парадиметиламинобензальдегида.

3. Добавьте 2 ст.л. раствора персульфата калия.

О присутствии индола свидетельствует появление во всей смеси нежного розовато-коричневого цвета, который при отстаивании слегка темнеет.

Индол тестируется во многих лабораториях с помощью обычной нитрозоиндольной реакции, которая, однако, не является столь деликатным методом, как описанный выше. Испытание проводится следующим образом:

1. Извлеките ватную пробку из пробирки и с помощью стерильной пипетки влейте в пробирку 1 ст.л. чистой концентрированной серной кислоты сбоку. Поставьте тюбик вертикально на подставку и дайте ему постоять, при необходимости, в течение десяти минут.

Розово-розовый или красный цвет на стыке двух жидкостей = индол (*плюс нитрит*).

2. Если цвет среды остается неизменным, добавьте 2 ст.л. 0,01%-ного раствора. растворите водный раствор нитрита натрия и снова дайте культуре настояться в течение десяти минут.

Красная окраска = индол.

Примечание.—Вместо проведения теста в два этапа, как указано выше, в культивирование может быть введено 2 ст. л. концентрированной *коммерческой* серной, соляной или азотной кислоты (все они содержат следы нитритов в растворе). Появление красного цвета в течение двадцати минут будет указывать на присутствие индола.

5а. Производство фенола.—

Требуемая среда:

Питательный бульон.

Требуемые реагенты:

Соляная кислота концентрированная.

Реагент Миллона.

Хлорид железа, 1%. водный раствор.

Способ.—

1. Приготовьте культивирование в колбе Bohemian, содержащей среду температурой не менее 50°С, и инкубируйте.

Проводят тест на наличие фенола следующим образом:

2. Добавьте 5°С, 25%. серную кислоту для культивирования и соедините колбу с конденсатором.

3. Перегоняйте при температуре 15-20 °С. Разделите дистиллят на три порции *a*, *b* и *c*.

4. Добавьте в (а) 0,5 стакана реагента Миллона и прокипятите.

Красный цвет = фенол.

5. Добавьте в (b) примерно 0,5 стакана раствора хлорида железа. Фиолетовый цвет = фенол.

(Если дистиллят будет кислым, реакция будет отрицательной.)

6. Добавьте до (с) брома воду. Кристаллический белый элемент трибромфенола = фенол.

Примечание.—Если индол и фенол, по-видимому, присутствуют в культурах одного и того же организма, перед тестированием их следует разделить. Это может быть сделано следующим образом:

1. Приготовьте бульон без добавок, скажем, при температуре 200 или 300 ° с, в термосе, как и раньше.

2. Окончательно придайте кислоту, добавив уксусную кислоту, и соедините колбу с конденсатором.

3. Перегонять при температуре от 50 до 70 °с.

Дистиллят будет содержать как индол, так и фенол.

4. Сделайте дистиллят сильно щелочным с помощью едкого поташа и редистила.

Дистиллят будет содержать индол; остаток будет содержать фенол.

5. Проверьте дистиллят на наличие индола (*предварительно*).

6. Остывший осадок пропитайте углекислым газом и редистилом.

7. Проверьте этот дистиллят на наличие фенола (*предварительно*).

6. Производство пигмента.—

1. Подготовьте образцы для культивирования в пробирках на различных средах и инкубируйте в различных условиях, касающихся температуры (при 37° С и при 20 °С), атмосферы (аэробной и анаэробной) и освещения (воздействие и защита от него).

Обратите внимание на условия, наиболее благоприятные для образования пигмента.

2. Обратите внимание на растворимость пигмента в различных растворителях, таких как вода (горячая и холодная), спирт, эфир, хлороформ, бензол, бисульфид углерода.

3. Обратите внимание на влияние кислот и щелочей соответственно на культивирование пигмента или на растворы пигмента.

4. Обратите внимание на спектроскопические реакции.

7. Образование восстановителя.—

(а) Разрушение цвета.—

1. Подготовьте пробирки для культивирования в питательном бульоне, окрашенном лакмусовой бумажкой, розоловой кислотой нейтрального красного цвета, и инкубируйте.
2. Каждый день осматривайте культуры и отмечайте, не происходит ли каких-либо изменений цвета.

(b) Превращение нитратов в нитриты.—

Требуемая среда:

Бульон с нитратами (*видео*, стр. 185).
Или раствор нитратпептона (*смотрите* на странице 186).

Требуемые реагенты:

Серная кислота (25%).
Метафенилендиамин, 5%. водный раствор.

Способ.—

1. Подготовьте образцы для культивирования в пробирках и инкубируйте вместе с контрольными пробирками (*т.е.* некультивированными пробирками с той же средой, помещенными в идентичные условия окружающей среды).

Эта предосторожность необходима, поскольку среда способна поглощать нитриты из атмосферы, и мнение об отсутствии нитритов при культивировании часто основывается на одинаковой окраске среды в контрольной пробирке.

Проверьте пробирку для культивирования и контрольную пробирку на наличие нитритов.

2. Добавьте несколько капель серной кислоты в среду в каждой из пробирок.
3. Затем влейте в каждую пробирку 2-3 ч.л. метафенилендиамина. Коричневато-красный цвет = нитриты.

Глубина цвета пропорциональна количеству присутствующего вещества.

8. Добыча газа.—

(A) двуокись углерода и водород.—

Требуемое оборудование:

Пробирки для брожения (*видео*, стр. 161), содержащие сахарный бульон (глюкоза, лактоза и др.). Среду следует готовить из бульона, не содержащего инозитов (*видео*, стр. 183).

Требуемый реагент:

n/2 каустической соды.

Способ.—

1. Инокулируйте поверхность среды в колбе ферментационной пробирки и инкубируйте.
2. Отмечайте уровень жидкости в закрытом патрубке ферментационной трубки с интервалом в двадцать четыре часа, а когда выделение газа прекратится, измерьте длину столба газа с помощью миллиметровой шкалы.

Выразите этот столб газа в процентах от всей длины закрытого ответвления.

3. Для анализа газа и приблизительного определения относительных соотношений CO_2 и H_2 действуйте следующим образом:

Наполните колбу пробирки для брожения раствором каустической соды.

Закройте горловину колбы резиновой пробкой.

Попеременно переворачивайте пробирку шесть или восемь раз, чтобы привести содовый раствор в плотный контакт с газом.

Верните остаточный газ в конец закрытого патрубка и измерьте.

Потеря объема газа = двуокиси углерода.

Остаточный газ = водород.

Подайте газ в колбу трубки и взорвите ее, поднеся к ней зажженную свечу.

(В) Сероводород.—

Требуемые носители:

Раствор пептона железа (*видео*, стр. 185).

Раствор свинцового пептона.

1. Инокулируйте пробирки со средой и инкубируйте вместе с контрольными пробирками.
2. Проводите обследование изо дня в день с интервалом в двадцать четыре часа.

Выделение H_2S приведет к тому, что желтовато-белый осадок потемнеет до коричневатого или угольно-черного цвета, причем глубина цвета пропорциональна количеству присутствующего сероводорода.

Количественный: Для точного количественного анализа газов, выделяемых бактериями из определенных сред определенного состава, необходимо использовать методы, разработанные компанией Pakes, а именно:

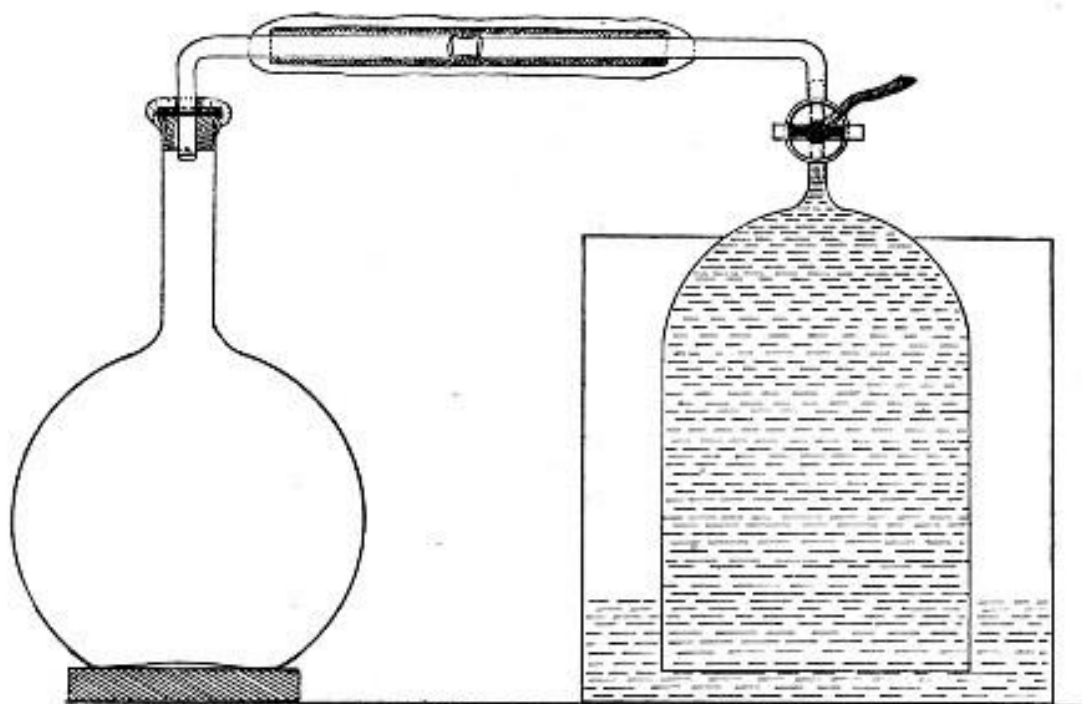


Рис.

153.газосборное устройство.

Требуемое оборудование:

Чешская колба (емкостью от 300 до 1500 °с), содержащая от 100 до 400°с среды. Горловина колбы снабжена перфорированной резиновой пробкой, на которой закреплен Г-образный кусок стеклянной трубки (короткий рукав проходит как раз через пробку). К длинному плечу трубки прикреплен отрезок напорной трубки длиной около 8 см, заткнутый на свободном конце кусочком ваты. Точно измерьте общую емкость колбы и выходной трубки, а также количество содержащейся среды. Обратите внимание на разницу.

Газовый ресивер. Это колпак из прочного стекла высотой 14 см и диаметром 9 см. В его верхушку вплавлена стеклянная трубка. Он поднимается вертикально на 5 см, а затем сгибается под прямым углом, при этом горизонтальный рычаг имеет длину 10 см. Трехходовой кран подводится горизонтально к вертикальной трубе чуть выше ее соединения с колпаком.

Железный цилиндр, достаточно большой, чтобы вместить стеклянную банку.

Около 15 килограммов металлической ртути.

Расплавленный парафин.

Аппарат Orsat-Lunge, работающий с ртутью вместо воды, снабженный двумя газовыми трубками дополнительной длины (емкостью 120 и 60 гц соответственно и градуированными по всей длине, обе имеют водяную рубашку) или другим газоаналитическим прибором, способным определять CO_2 , O_2 , H_2 и N_2 .

Способ.—

1. Инокулируйте среду в колбу обычным способом, с помощью платиновой иглы, следя за тем, чтобы горлышко колбы и резиновая пробка были тщательно прокалены до и после операции.

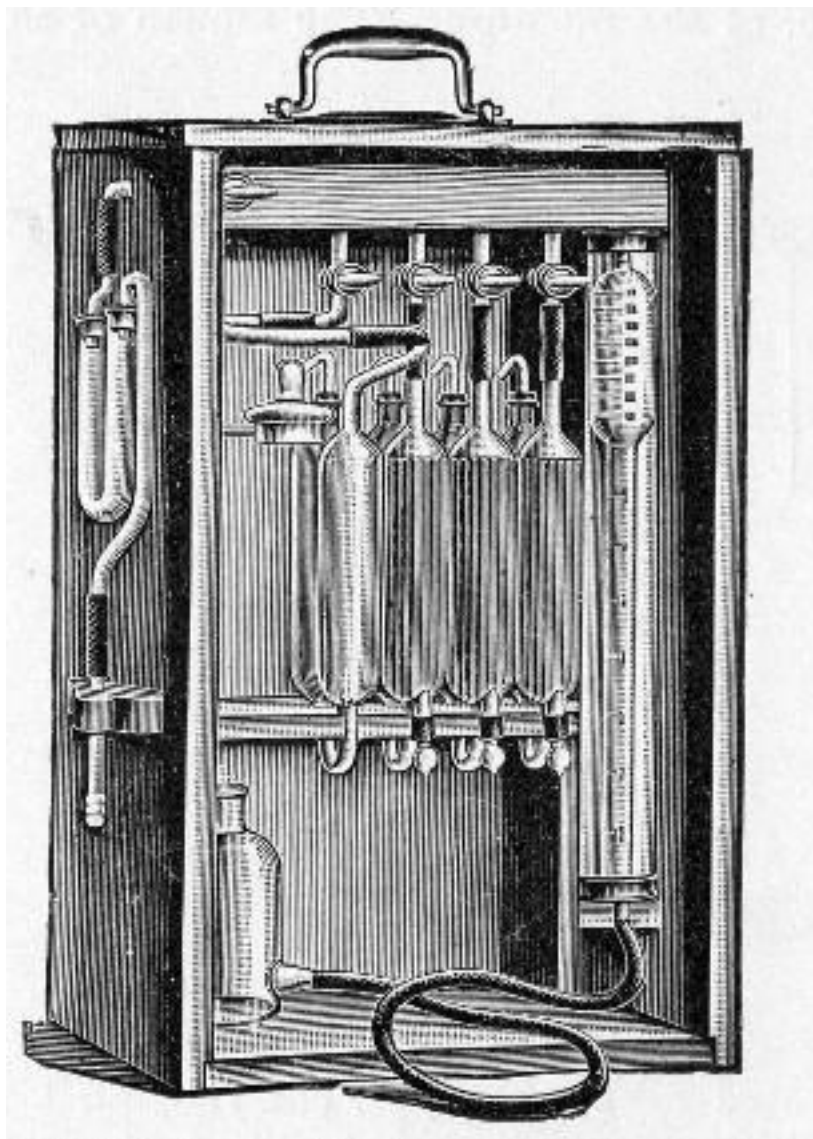


Рис. 154.—Аппарат для анализа газов

Orsat-Lunge.

2. Наполните железный цилиндр ртутью.

3. Опустите стеклянную банку горловиной вниз в емкость со ртутью, предварительно убедившись, что между внутренней частью банки и внешним воздухом имеется свободное сообщение, и засосите ртуть в кран; затем перекройте кран.

4. Заткните открытый конец трехходового крана растопленным воском.

5. Соедините горизонтальный рычаг культуральной колбы с рычагом газового ресивера с помощью напорной трубки (после снятия ватной пробки с резиновой трубки), как показано на рис. 153.

6. Поверните трехходовой кран на пол-оборота, чтобы открыть соединение между колбой и приемником, и заделайте все стыки, покрыв пленкой расплавленного воска. При повороте крана ртуть в приемнике естественным образом выпадет.
7. Поместите весь прибор в инкубатор. (Через два часа, когда температура прибора сравняется с температурой инкубатора, отметьте высоту ртутного столба на приемнике.)
8. Ежедневно проверяйте устройство и отмечайте уровень ртути в приемнике с интервалом в двадцать четыре часа.
9. Когда выделение газа прекратится, извлеките аппарат из инкубатора; удалите воск из сопла трехходового крана (предварительно отрегулировав кран таким образом, чтобы не происходило утечки газа) и подсоедините его к аппарату Orsat.
10. Удалите, скажем, 100 грамм газа из приемника, поверните кран вспять и перелейте его в колбу для культивирования. Удалите 100°с смеси газов из колбы для культивирования и установите на место в приемнике.

Повторите эти процессы три или четыре раза, чтобы обеспечить тщательное перемешивание содержимого колбы и приемника.

11. Теперь заберите пробу смешанных газов в Orsat и проведите анализ.

При расчете результатов учитывайте объем воздуха, содержавшегося в колбе в начале эксперимента.

Для сбора газов, образующихся в анаэробных условиях, применяется несколько иная процедура:

1. Закрепите культуральную колбу (емкостью 500 куб.см) перфорированной резиновой пробкой, в которую вставлен L-образный отрезок трубки манометра, каждое плечо длиной 5 см.
2. Подготовьте второй отрезок трубки L-образной формы, с коротким плечом 5 см и длинным плечом 20 см, и соедините его короткое плечо с горизонтальным плечом трубки в колбе для культивирования с помощью отрезка напорной трубки, снабженной винтовым зажимом.
3. Полностью заполните культуральную колбу кипящей средой и проденьте длинный отрезок трубки через пробку колбы Эрленмейера (емкостью 150 °с), которая содержит 100°с той же среды.
4. Стерилизуйте эти соединенные колбы прерывистым методом обычным способом.

Сразу по завершении последней стерилизации завинтите зажим на соединяющей их напорной трубке и дайте им остыть.

Когда жидкость охлаждается и сжимается, в горловине колбы под резиновой пробкой образуется вакуум.

5. Для инокуляции в культуральную колбу извлеките длинный конец изогнутой трубки из колбы Эрленмейера и опустите ее на дно пробирки, содержащей молодую культуру (в жидкой среде, аналогичной той, что содержится в культуральной колбе) организма, который требуется исследовать.

6. Слегка ослабьте зажим на напорной трубке, чтобы в колбу попало 4-5 мл культуры.
7. Плотно зажмите резиновую трубку; извлеките изогнутую стеклянную трубку из пробирки для культивирования и опустите ее в колбу с недавно прокипяченной и быстро охлажденной дистиллированной водой.
8. Снова ослабьте зажим и промойте остатки культивирования до тех пор, пока колба для культивирования и трубка полностью не заполнятся водой.
9. Плотно зажмите резиновую трубку и снимите стеклянную трубку с длинными рычагами.
10. Подготовьте газовый ресивер, как в предыдущем методе (однако в этом случае ртуть следует слегка подогреть), и заполните горизонтальный рычаг ресивера горячей водой.
11. Подсоедините колбу для культивирования к горизонтальному кронштейну газового приемника.
12. Снимите винтовой зажим с резиновой трубки, отрегулируйте трехходовой кран, заделайте все соединения расплавленным воском и выдержите.
13. Завершите исследование, как описано для предыдущего метода.

ФИЗИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ.

Изучите культивирование организма с точки зрения его роста и развития под следующими заголовками:

Атмосфера:

- а) в присутствии кислорода.
- б) в отсутствие кислорода.
- с) в присутствии газов, отличных от кислорода.

Температура:

- а) Дальность полета.
- б) Оптимальный.
- с) Точка термической смерти:

Влажный: Вегетативные формы.

Споры.

Сухие: Вегетативные формы.

Споры.

Реакция среды.

Устойчивость к смертельным агентам:

а) обезвоживание.

(b) Свет: рассеянный.

Прямой.

Основные цвета.

(с) Тепло.

d) Химические антисептики и дезинфицирующие средства.

Жизнеспособность в искусственных культурах.

I. Атмосфера.— Вопрос о том, является ли наблюдаемый организм (а) облигатным аэробом, (б) факультативным анаэробом или (в) облигатным анаэробом, в общих чертах решается по появлению культиваций в ферментационных пробирках. Очевидный рост в закрытом отводе, а также в колбе или в перевернутой газовой трубке, а также в объеме среды укажет на то, что это факультативный анаэроб; в то время как рост, происходящий только в колбе или в закрытом отводе, показывает, что это облигатный аэроб или анаэроб соответственно. Этот метод, однако, недостаточно точен для данной цели, и обследование организма на предмет его поведения в отсутствие кислорода проводится следующим образом:

Требуемое устройство:

Трубки Бюхнера.

Аппарат Буллоха.

Вытяжной насос.

Пирогалловую кислоту.

Деканонизированную каустическую соду.

Требуемые носители:

Агар с формиатом глюкозы.

Желатин с формиатом глюкозы.

Бульон из формиата глюкозы.

Способ.—

1. Подготовьте четыре набора культиваций:

(А) агар с формиатом глюкозы с наклоном и аэробную инкубацию при 37°C.

Желатин формируют из скошенной глюкозы и аэробно инкубируют при 20°C.

(В) наклонный глюкозный агар для анаэробной инкубации при 37°C.

Желатин из формиата глюкозы с уклоном для анаэробной инкубации при 20°C.

(С) наклонный глюкозоформиатный агар для анаэробной инкубации при 37°C.

Бульон из формиата глюкозы для анаэробной инкубации при 37° С.

(D) желатин из формиата глюкозы с уклоном для анаэробной инкубации при 20°C.

Бульон из формиата глюкозы для анаэробной инкубации при 20° С.

2. Запечатайте культуры, образующие набор В, в пробирки Бюхнера (*видео*, стр. 239).

3. Закройте набор для формирования культур С в аппарате Буллоха; удалите воздух с помощью вакуумного насоса и обеспечьте поглощение любого остаточного кислорода путем введения пирогалловой кислоты и едкого натра в раствор (*смотрите* стр. 245). Обработайте набор D таким же образом.

4. Наблюдайте за культивированием макроскопически и микроскопически с интервалом в двадцать четыре часа до завершения, при необходимости, семидневной инкубации.

5. Контролируйте эти результаты.

Газы, отличные от кислорода.—

Требуемое устройство:

Аппарат Буллоха.

Стерильный газовый фильтр (*видео*, стр. 40).

Газометр, содержащий газ, который желательно протестировать (SO₂, N₂O, NO, CO₂ и т.д.) Или газогенератор для его производства.

Способ.—

1. Подготовьте не менее семи пробирочных культиваторов на твердых средах и поместите их в аппарат Буллоха.

2. Соедините входную трубку баллона Буллоха со стерильным газовым фильтром, а затем снова с подающей трубкой газометра или газогенератора.

3. Откройте оба запорных крана аппарата Буллоха и пропускайте газ до тех пор, пока он полностью не заменит воздух в колпаке, как показано результатом анализа проб, взятых из выходной трубки.

4. Инкубируйте при оптимальных температурных условиях.

5. Проверяйте культивации с интервалом в двадцать четыре часа до истечения семи дней.

6. Каждый день извлекайте по одной пробирке изнутри аппарата. Если рост не виден, инкубируйте пробирку в оптимальных условиях с точки зрения температуры и атмосферы и таким образом определите продолжительность воздействия газа, необходимую для уничтожения наблюдаемых организмов.

7. Контролируйте эти результаты.

II. Температура.—

A) *Дальность полета.*—

1. Подготовьте серию из десяти пробирочных культивирований в жидкой среде оптимальной реакции.

2. Установите серию инкубаторов с фиксированной температурой, варьирующейся от 5 ° C до 50 ° C.

(При отсутствии достаточного количества инкубаторов используйте водяную баню, используемую для определения температуры гибели вегетативных форм.)

3. Инкубируйте по одному пробирному культивированию организма аэробным или анаэробным способом, в зависимости от необходимости, в каждом инкубаторе и исследуйте с получасовыми интервалами в течение от пяти до восемнадцати часов.

4. Обратите внимание на температуру, при которой рост впервые наблюдается макроскопически (Оптимальная температура).

5. Продолжайте инкубацию до истечения семи дней. Обратите внимание на экстремальные температуры, при которых происходит рост (диапазон температур).

6. Контролируйте эти результаты — при необходимости организуйте серию инкубаторов таким образом, чтобы каждый градус по Цельсию превышал на пять градусов каждый из крайних значений, отмеченных ранее.

B) *Оптимальный.*—

1. Подготовьте вторую серию из десяти культиваций в пробирках в условиях, аналогичных реакции среды.

2. Инкубировать в серии инкубаторов, в которых температуру регулируют с интервалом в 1°C. на пять градусов с каждой стороны от оптимальной температуры, наблюдавшейся в предыдущем эксперименте (A, этап 4).

3. Повторите наблюдение с интервалом в полчаса и обратите внимание, что температура, при которой рост впервые виден невооруженным глазом, = оптимальной температуре.

(C) *Точка тепловой смерти (t. d. p.)-*

Влажно—вегетативные формы:

The *t. d. p.* здесь - это та **температура** которая с уверенностью убивает водянистую взвесь рассматриваемых организмов после воздействия в течение **10 минут**.

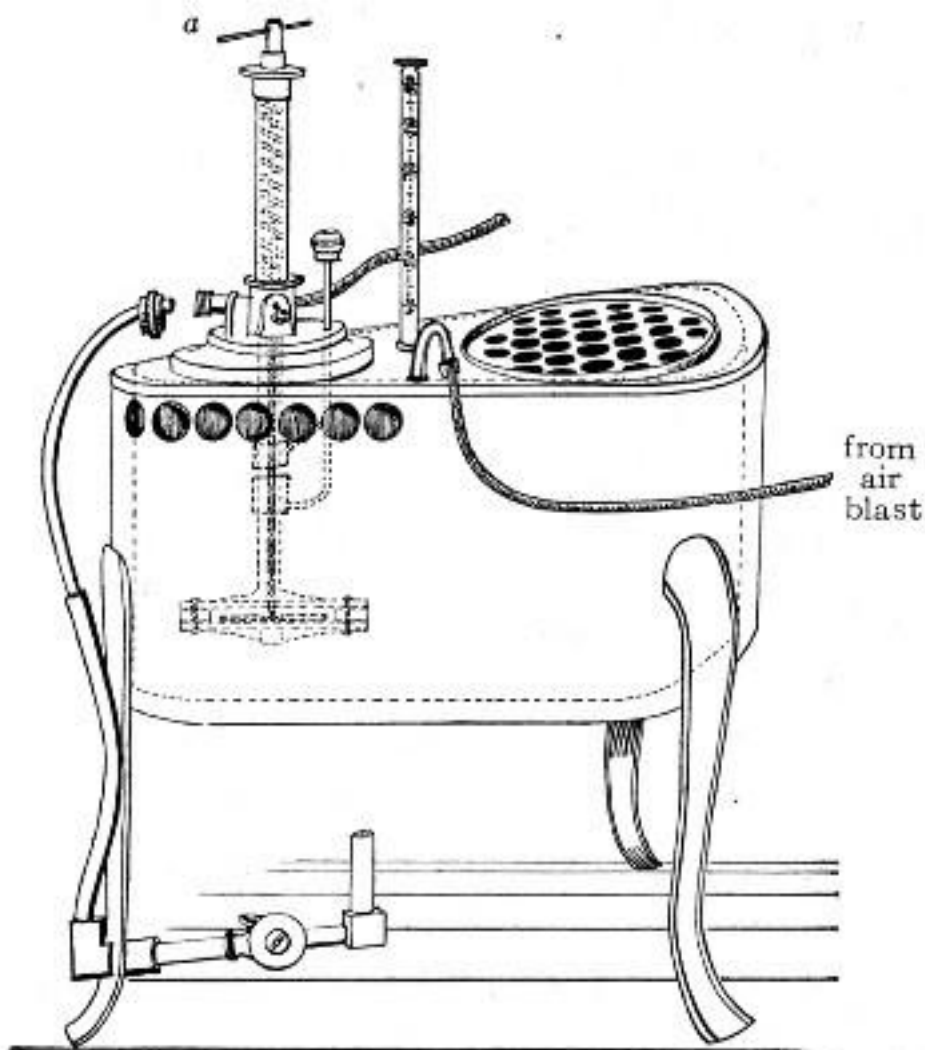


Рис. 155. Водяная ванна

Херсона.

Требуемое устройство:

Водяная баня. Для наблюдения за точкой термической смерти необходима специальная водяная баня. Температура этого устройства регулируется с помощью капсульного регулятора, который можно регулировать с интервалом в полградуса по Цельсию в диапазоне 30 °, от 50 ° C до 80 ° C. С помощью пружины, приводимой в действие ручкой *a*, которая увеличивает давление внутри капсулы. Предусмотрено отверстие для приема сопла струйного насоса, чтобы поток воздуха мог проходить через воду во время использования ванны и, таким образом, обеспечивать равномерную температуру ее содержимого. Через второе отверстие подвешен сертифицированный стоградусный термометр, колба которого, хотя и полностью погружена в воду, приподнята как минимум на 2 см. над полом ванны.

Стерильные стеклянные капсулы.

Колба, содержащая 250-градусный стерильный физиологический раствор.

Коробка стерильных пипеток, 10 °с (в десятых долях кубического сантиметра).

Специальная платиновая петля.

Пробирки размером 18 на 1,5 см из тонкого немецкого стекла.

Ящик со стерильными чашками петри.

Трубочки с агаром или желатином.

Способ.—

1. Подготовьте образцы для культивирования в пробирках на твердых средах оптимальной реакции; инкубируйте сорок восемь часов при оптимальных условиях температуры и атмосферы.
2. Исследуйте препараты, полученные при культивировании, под микроскопом, чтобы определить отсутствие спор.
3. Разлейте пипеткой по 5 ст.л. солевого раствора в каждую из двенадцати капсул.
4. Подвесьте три полные петли *surface growth* (используя специальную платиновую петлю, *видео* стр. 316) в физиологическом растворе, равномерно распределив эмульсию по влажным стенкам каждой капсулы.
5. Перелейте эмульсию из каждой капсулы в стерильную колбу с температурой 250°С и перемешайте.
6. Разлейте пипеткой 5-градусную эмульсию в каждую из двенадцати стерильных пробирок, пронумерованных последовательно.
7. Установите первую трубку в водяную баню с регулируемой температурой 40 ° С с помощью двух резиновых колец вокруг трубки, одно над, а другое под перфорированной верхней частью ванны, так, чтобы верхний уровень жидкости в трубке был примерно на 4 см ниже поверхности воды в ванне, а дно трубки находилось на таком же расстоянии от дна ванны.
8. Подготовьте контрольную пробирку, содержащую 5%-ный стерильный физиологический раствор, в аналогичных условиях. Заткните пробирку ватой и проденьте термометр через пробку так, чтобы его колба была погружена в воду.
9. Закройте незанятые отверстия в крышке водяной бани с помощью стеклянных шариков.
10. Следите за термометром в пробирке, пока он не покажет температуру 40 ° С. Обратите внимание на время. Через десять минут извлеките пробирку с суспензией и быстро охладите, погрузив ее нижний конец в струю проточной воды.
11. Налейте в три тарелки желатин (или агар), содержащие соответственно 0,2, 0,3 и 0,5 ч.л. суспензии, и инкубируйте.
12. Перелейте оставшиеся 4 ст.л. суспензии пипеткой в культуральную колбу, содержащую 250 ст.л. питательного бульона, и инкубируйте.
13. Наблюдайте за этими обработками изо дня в день. "Отсутствие роста" не должно регистрироваться как окончательное до завершения семидневной инкубации.

14. Распространите эти наблюдения на остальные пробирки серии, но измените условия так, чтобы каждая пробирка подвергалась воздействию температуры на 2 ° C выше, чем непосредственно предшествующая, —т. е. 42 ° C, 44 ° C, 46 ° C и так далее.

15. Обратите внимание, что температура, после воздействия которой рост не происходит до конца семидневной инкубации, = точка тепловой смерти.

16. Если требуется большая точность, можно подготовить вторую серию пробирок и подвергнуть их в течение десяти минут воздействию фиксированных температур, изменяющихся всего на 0,5 ° C в диапазоне 5 ° C по обе стороны от ранее наблюдавшейся мертвой точки.

Влажные споры: Точкой термической гибели в случае спор является то **время воздействия фиксированной температуры 100°C**, которое необходимо для уничтожения всех спор, присутствующих в суспензии.

Примечание.—Если желательно сохранять **время постоянным 10 минут** и исследовать температуру, необходимую для уничтожения спор, необходимо добавлять в воду в ванне различные количества хлорида кальция, когда температура кипения поднимется выше 100 ° C. в зависимости от процентного содержания кальция в растворе. В таком случае используйте ванночку, указанную на стр. 227; ванночку, указанную на стр. 299, можно использовать только в том случае, если предварительно извлечь капсулу.

Это определяется следующим образом

Требуемое устройство:

Паровой баллон оснащен нагнетательной трубкой и трубкой предохранительного клапана большого диаметра.

На водяной бане при температуре 100° C.

Колба Эрленмейера емкостью 500°с, содержащая 140°с стерильного физиологического раствора и снабженная резиновой пробкой с четырьмя отверстиями.

Резиновая пробка устанавливается следующим образом:

(a) Термометр с температурой 120° C, его колба погружена в физиологический раствор.

(b) Трубка с прямым входом, доходящая до дна колбы, верхний конец которой заткнут ватой.

(c) Изогнутая сифонная трубка с насадкой для пипетки, прикрепленной с помощью резиновой трубки и снабженной нажимным краном.

Насадку защищают от случайного загрязнения, пропуская ее через ватную пробку небольшой пробирки.

(d) кусок стеклянной трубки в форме серпа, проходящий прямо через пробку, заткнутую ватой, которая служит выпускным отверстием для пара.

Стерильные тарелки.

Стерильные пипетки.

Стерильные пробирки, градуированные на содержание 5 гр.с.

Требуемые носители:

Желатин или агар.

Колбы для культивирования, содержащие 200 г питательного бульона.

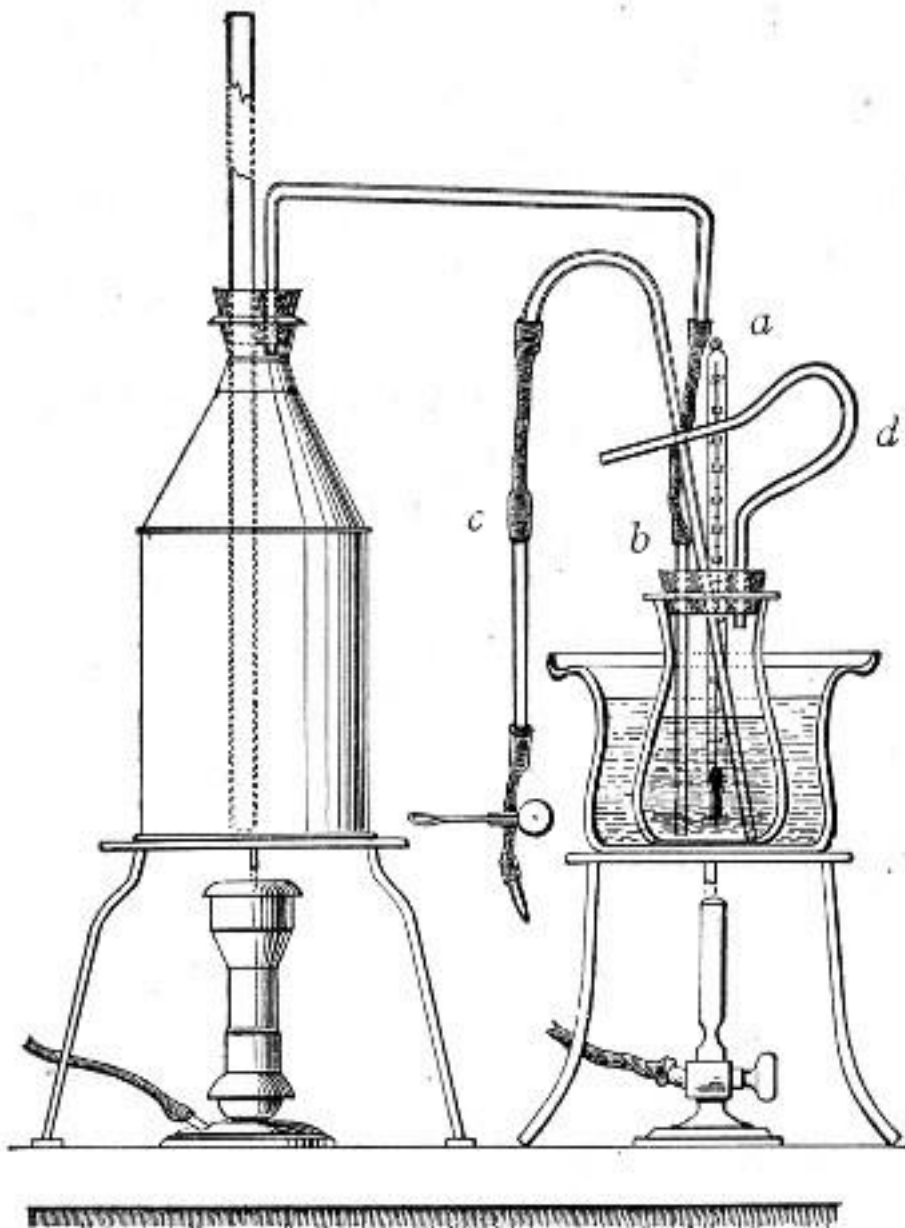


Рис. 156. Устройство

для определения точки гибели спор.

Способ.—

1. Подготовьте двенадцать образцов для культивирования в пробирках на поверхности (или две культуры в больших плоских бутылках для культивирования — видео стр. 5) питательного агара и инкубируйте в оптимальных условиях (определенных ранее) для образования спор.

Исследуйте препараты из культур под микроскопом, чтобы определить наличие спор.

2. Наберите пипеткой 5 мл стерильного физиологического раствора в каждую пробирку для культивирования или 30 мл физиологического раствора в каждую бутылочку и с помощью стерильной платиновой лопаточки эмульгируйте раствором всю поверхность роста.

3. Добавьте эмульсию при температуре 60°С к физиологическому раствору при температуре 140°С, содержащемуся в прилагаемой колбе Эрленмейера.

4. Поместите колбу на водяную баню с кипящей водой.

5. После удаления пробки из ваты соедините прямую трубку с подающей трубкой парового баллона; снимите пробку с вентиляционной трубки.

6. Когда температура термометра достигнет 100 °С, откройте пружинный зажим на *сифоне*, удалите первый кубический сантиметр суспензии, которая перелилась через сифон (*т. е.* Содержимое сифонной трубки); следующие 5°С суспензии соберите в стерильную градуированную пробирку, разлейте по чашкам и приготовьте из них культуры, как в предыдущих экспериментах.

7. Повторяйте этот процесс с интервалом в двадцать пять минут приготовления на пару.

8. Наблюдайте за инокулированными планшетами и колбами до завершения, при необходимости, семидневной инкубации.

9. Контролируйте эти эксперименты, но в данном случае откачивайте порции суспензии сифоном с интервалами от половины до одной минуты в течение пяти или десяти минут, предшествующих ранее определенной точке смерти.

Точка тепловой смерти. -

Сухо—вегетативные формы: Точкой термической смерти в данном случае является та **температура**, которая с уверенностью убивает тонкую пленку рассматриваемого организма после временного воздействия в **десять минут**.

Требуемое устройство:

Воздушная печь с терморегулятором.

Стерильные покровные салфетки.

Колба, содержащая 250-градусный стерильный физиологический раствор.

Коробка стерильных пипеток, 10 °С (в десятых долях кубического сантиметра).

Коробка со стерильными капсулами.

Щипцы для тиглей.

Способ.—

1. Приготовьте эмульсию из трех петель, полученных при оптимальном культивировании, в 5-градусном физиологическом растворе в стерильной капсуле и исследуйте под микроскопом, чтобы определить отсутствие спорных форм.
2. Сделайте двенадцать покровных пленок на стерильных покровных листах; поместите каждую в стерильную капсулу для просушки.
3. По очереди запекайте каждую капсулу в духовке с горячим воздухом в течение десяти минут при разной фиксированной температуре, варьируемой на 5 ° C, от 60 ° C до 120 ° C.
4. Сразу по истечении десяти минут извлеките каждую капсулу из печи с помощью тигельных щипцов; снимите защитное стекло с внутренней стороны стерильными щипцами.
5. Поместите пленку в колбу с 200 гр. питательного бульона.
6. Подготовьте субкультуры из таких колб, в которых имеются признаки роста, чтобы определить, что случайного заражения не произошло, но что за рост ответственен организм, первоначально попавший на пленку.
7. Контролируйте результат этих экспериментов.

Сухие споры: Точкой термической гибели в данном случае является та **температура** которая с уверенностью убивает споры рассматриваемого организма, находящиеся в тонкой пленке после выдержки в течение **10 минут**.

Требуемое устройство:

Что касается вегетативных форм.

Способ.—

1. Подготовьте наклонную пробирку с агаром для культивирования и инкубируйте в оптимальных условиях с точки зрения образования спор.
2. Наберите пипеткой 5 мл стерильного физиологического раствора в пробирку для культивирования и эмульгируйте в ней весь поверхностный рост. Исследуйте под микроскопом, чтобы определить наличие спор в большом количестве.
3. Разложите тонкими ровными пленками двенадцать стерильных покровных листов и поместите каждый покровный лист в отдельную стерильную капсулу.
4. По очереди выдерживайте каждую капсулу в течение десяти минут при разной фиксированной температуре, варьируемой на 5 ° C, в диапазоне от 100 ° C до 160°C.
5. Завершите обследование вегетативных форм.

III. Реакция среды.

(А) Диапазон.—

1. Приготовьте бульонную культуру организма и инкубируйте при оптимальных условиях с точки зрения температуры и атмосферы в течение двадцати четырех часов.

2. Перелейте 0,1 стакана препарата в стерильную капсулу; добавьте 9,9 стакана стерильного бульона и тщательно перемешайте.
3. Приготовьте серию трубочек с питательным бульоном различной реакции, от +25 до -30 (см. стр. 155), а именно.: +25, +20, +15, +10, +5, нейтральный, -5, -10, -15, -20, -25, -30.
4. С помощью стерильной градуированной пипетки инокулируйте в каждую бульонную пробирку 0,1 стакана разведенного разведения и инкубируйте при оптимальных условиях.
5. Наблюдайте за посевами с интервалом в полчаса с третьего по двенадцатый час. Обратите внимание на реакцию пробирки или пробирок, в которых рост впервые виден макроскопически (вероятно, оптимальная реакция).
6. Продолжайте инкубацию до истечения, при необходимости, семи дней. Обратите внимание на крайние значения кислотности и щелочности, при которых развивается макроскопический рост (Диапазон реакции).
7. Контролируйте результат этих наблюдений.

(В) Оптимальная реакция.— Оптимальная реакция уже была приблизительно определена при наблюдении за диапазоном. Это может быть зафиксировано в более узких пределах путем инокуляции аналогичным образом серии трубочек с бульоном, которые представляют меньшие вариации реакции, чем те, которые использовались ранее (скажем, 1 вместо 5) для пяти точек по обе стороны от ранее наблюдавшегося оптимального значения. Например, оптимальная реакция, наблюдавшаяся в серии экспериментов по определению диапазона, составляла +10. Теперь посадите пробирки с реакцией +15, +14, +13, +12, +11, +10, +9, +8, +7, +6, +5, и наблюдайте, как раньше.

IV. Устойчивость к смертельным агентам.—

(А) Обезвоживание.—

Требуемое устройство:

Эксикатор Мюллера. Он состоит из раструба, оснащенного выпускной трубкой и запорным краном (*d*), который может быть прикреплен к основанию из листового стекла (*c*) с помощью воска или смазки. Он содержит цилиндрический сосуд из пористой глины (*a*), в верхнюю часть которого наливается чистая серная кислота, в то время как высушиваемый материал помещается внутри его стенок на стеклянную полку (*b*). Воздух выходит изнутри, и кислота быстро превращает глиняный сосуд в большую впитывающую поверхность (рис. 157).

Вытяжной насос.

Чистая концентрированная серная кислота.

Стерильные покровные салфетки.

Стерильные щипцы.

Колба для культивирования, содержащая 200 мл питательного бульона.

Стерильная вентилируемая чашка Петри. Его готовят, сгибая три коротких куса алюминиевой проволоки в форме буквы V, подвешивая их к краю нижнего блюда и накрывая крышкой (рис. 158).

Способ.—

1. Подготовьте поверхностное культивирование на питательном агаре в бутылке для культивирования и инкубируйте при оптимальных условиях в течение сорока восьми часов.
2. Исследуйте препараты, полученные в результате культивирования, под микроскопом, чтобы определить отсутствие спор.
3. Наберите пипеткой 5 мл стерильного физиологического раствора в колбу и приостановите в ней весь рост.
4. Распределите суспензию тонкими ровными пленками на стерильных покровных листах и положите в стерильные "тарелочки" для просушки.
5. Как только пленки высохнут, перенесите их с помощью стерильных пинцетов в вентилируемую чашку Петри.

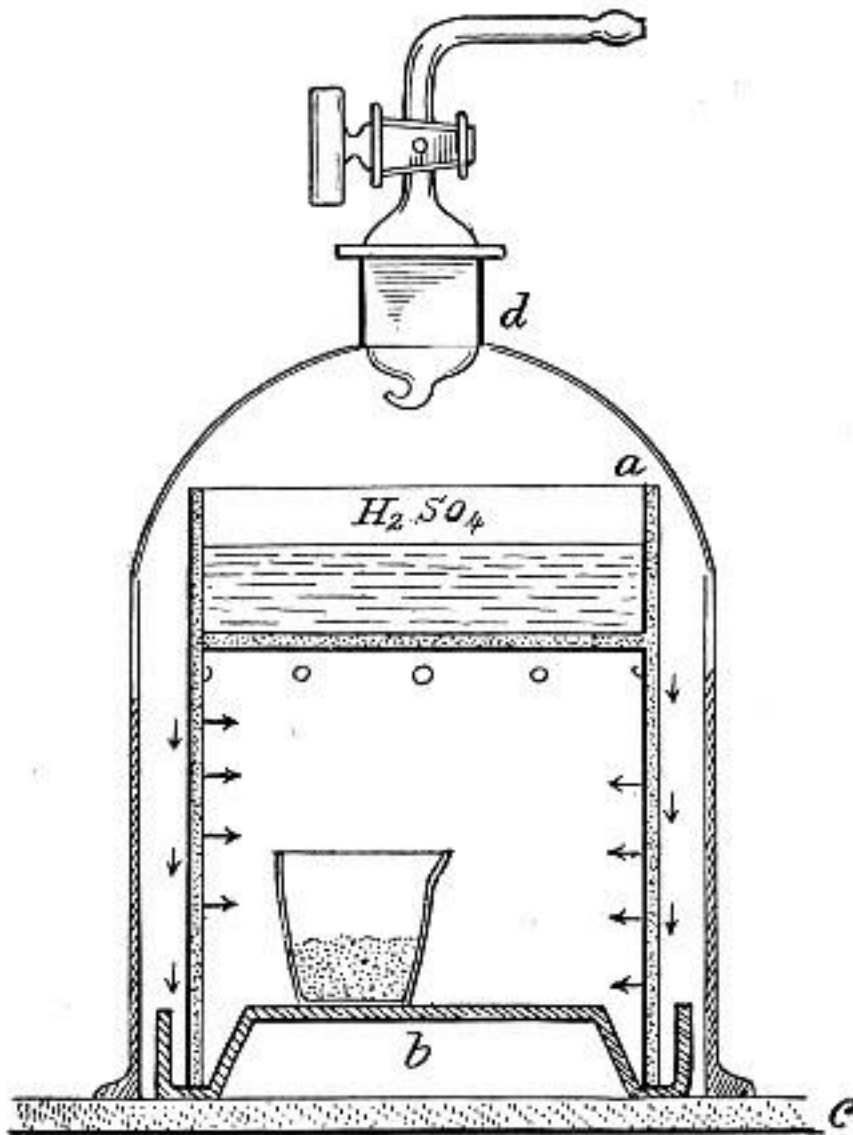
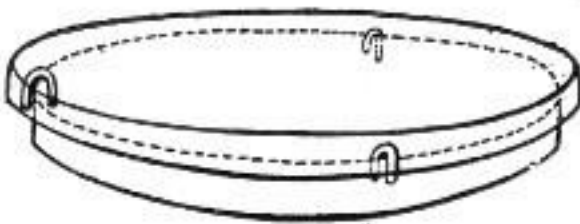


Рис. 157.—Эксикатор Мюллера.

6. Поместите чашку Петри в эксикатор Мюллера; заполните верхнюю камеру чистой серной кислотой, накройте колпаком и выпустите воздух из нее. Через десять минут подсоедините эксикатор к емкости для промывки серной кислотой, в которую вставлен воздушный фильтр, чтобы пропускать только сухой стерильный воздух.



растений.

Рис. 158. Чашка Петри для сушки культивируемых

7. С интервалом в пять часов открывайте аппарат, снимайте одну из защитных пленок с чашки Петри и переносите ее внутрь культуральной колбы, соблюдая все меры предосторожности против загрязнения. Снова закройте эксикатор и снова выпустите воздух, а затем впустите сухой стерильный воздух, как и раньше.

8. Инкубируйте колбу с культурой в оптимальных условиях до истечения семи дней, если необходимо; и определите время воздействия, при котором наступает смерть.

9. Полейте чашки из тех колб с культурами, в которых они растут, чтобы определить отсутствие загрязнения.

10. Повторяйте эти наблюдения с часовыми интервалами в течение пяти часов, предшествующих моменту смерти и следующих за ним, как определено в первой серии экспериментов.

(В) Свет.—

а) рассеянный дневной свет:

1. Приготовьте пробирное культивирование в питательном бульоне и инкубируйте при оптимальных условиях в течение сорока восьми часов.

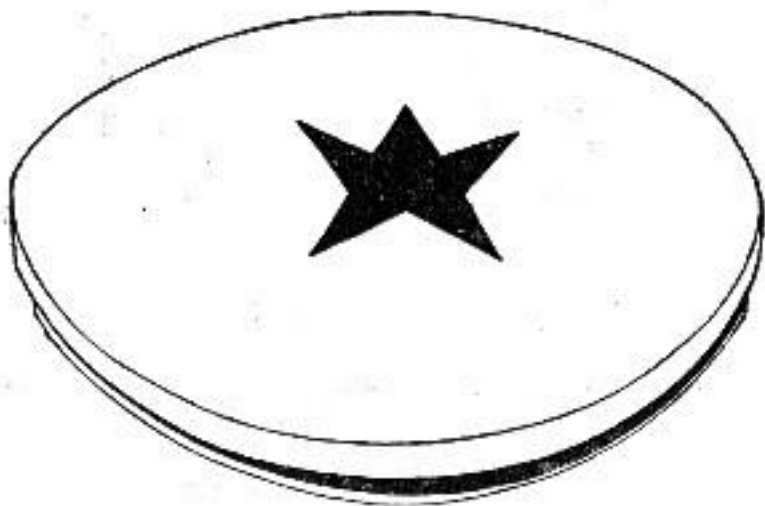


Рис. 159. Пластина со звездой для

проверки светового эффекта.

2. Налейте в двадцать тарелок десять порций питательного желатина и десять порций питательного агара, каждая из которых содержит 0,1 ч.л. бульонной культуры.

3. Поместите одну пластинку с агаром и одну пластинку с желатином в горячий и холодный инкубаторы соответственно в качестве *контрольных*.

4. Прикрепите лист черной бумаги, вырезанный в форме креста или звезды, к центру крышки каждой из оставшихся тарелок (рис. 159).

5. Подвергайте эти пластины воздействию рассеянного дневного света (не прямых солнечных лучей) в лаборатории в течение одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, восьми, десяти, двенадцати часов.

6. После воздействия света инкубируйте в оптимальных условиях.

7. Изучите образцы культивирования на пластинках после двадцатичетырехчасовой и сорока восьми часовой инкубации и сравните с двумя контрольными образцами. Запишите результаты. Если рост отсутствует на той части пластины, которая не защищена черной бумагой, продолжайте инкубацию и ежедневное наблюдение до истечения семи дней.

8. Контролируйте результаты.

b) Прямые солнечные лучи:

1. Подготовьте пластинчатые культуры точно так же, как в предыдущих экспериментах, и поместите два контрольных образца в инкубаторы.

2. Разложите оставшиеся тарелки на подставке под прямыми лучами солнца.

3. Поверх каждой тарелки поставьте небольшое стеклянное блюдо диаметром 14 см и глубиной 5 см.

4. Залейте раствор калийных квасцов (2% в дистиллированной воде) в каждую посуду на глубину 2 см. чтобы впитать тепло солнечных лучей и таким образом исключить возможное влияние температуры на ростки.

5. После воздействия в течение периодов, аналогичных тем, которые использовались в предыдущем эксперименте, инкубируйте и завершите наблюдение, как указано выше.

(с) Основные цвета: Каждый цвет — фиолетовый, синий, зеленый и красный — должен тестироваться отдельно.

1. Подготовьте пластинчатые культуры, как в предыдущих "легких" экспериментах, и инкубируйте контрольные образцы.

2. Прикрепите полоску черной бумаги шириной 3 см поперек одного диаметра крышки каждой тарелки.

3. Покройте оставшуюся поверхность обложки пленкой из чистого фотографического коллодия, содержащего 2% любого из следующих анилиновых красителей, по мере необходимости:

Хризоидин (для красного).

Малахитово-зеленый (для зеленого).

Эозин, голубоватый (для синего).

Метиловый фиолетовый (для фиолетового).

4. Подвергайте подготовленные таким образом пластины воздействию яркого дневного света (но не прямых солнечных лучей) в течение различных периодов и завершите наблюдения, как в предыдущих экспериментах. Бактерицидное действие света, по-видимому, зависит от более преломляемых лучей фиолетового конца спектра и отмечается независимо от того, пропускаются красно-желтые лучи или нет.

5. Контролируйте результаты.

Примечание.—Ультрафиолетовые лучи, получаемые от кварцевой ртутной лампы, с огромной скоростью уничтожают бактерии в лабораторных условиях.

(C) *Тепло.*—(Смотрите точку тепловой смерти, стр. 298.)

(D) *Антисептики и дезинфицирующие средства.*—Устойчивость, проявляемую любой данной бактерией к любому конкретному дезинфицирующему или бактерицидному средству, следует исследовать с учетом следующих моментов:

(A) **коэффициент ингибирования**—*т.е., тот процентное содержание дезинфицирующего средства, присутствующего в питательной среде, которого достаточно для предотвращения роста и размножения бактерий.*

(B) **низший коэффициент летальности**—*т.е., время воздействия necessary to kill vegetative forms of the bacterium suspended in water at 20° to 25° C, in which the disinfectant is present in medium....концентрации (недостаточной для того, чтобы вызвать плазмолиз). И если бактерия образует споры,*

(C) **повышенный летальный коэффициент**—*т.е., время воздействия необходимое для уничтожения спор бактерии в условиях, аналогичных тем, которые получены при B.*

Приведенный здесь пример относится только к определенным дезинфицирующим средствам:

а именно: —Двуххлористая ртуть;
Формальдегид;
Карболовая кислота;

исследовано в отношении *B. anthracis*, но методика практически аналогична для всех других химических дезинфицирующих средств.

Коэффициент торможения.—

Требуемое устройство:

Коробка стерильных пипеток, 10 грамм (в десятых долях).

Коробка стерильных пипеток, 1 куб.см (в десятых долях).

Стерильные пробирки или капсулы для разведений.

Тюбики с питательным бульоном, каждый из которых содержит отмеренное количество среды в 10 гр.

Культура агара двадцатичетырехчасовой выдержки недавно выделенного **B. Anthracis**.

Бактерициды:

1. Пятипроцентный. водный раствор карболовой кислоты.
2. Один процент. водный раствор перхлорида ртути.
3. Одна десятая процента. водный раствор формальдегида.

Способ.—

1. Расположите шесть бульонных трубочек последовательно от 1 до 6. Инокулируйте каждый из штаммов *B. anthracis* и сразу же добавляйте различные количества[10] раствора карболовой кислоты, а именно:

В пробирку 1 добавьте 2,0 с.с. (= 1: 100)
В пробирку 2 добавьте 1,0 с.с. (= 1:200)
В пробирку 3 добавьте 0,6 с.с. (= 1:300)
В пробирку 4 добавьте 0,5 с.с. (= 1:400)
В пробирку 5 добавьте 0,4 с.с. (= 1:500)
В пробирку 6 добавьте 0,2 с.с. (= 1:1000)

2. Подготовьте аналогичную серию культивирования в пробирках, пронумерованных последовательно от 7 до 12, и добавьте различные количества раствора перхлорида ртути, а именно:

К пробирке 7 добавить 0,1 (= 1:1000)
К пробирке 8 добавить 0,05 (= 1:2000)
К пробирке 9 добавить 0,03 (= 1:3000)
К пробирке 10 добавить 0,025 (= 1:4000)
К пробирке 11 добавить 0,02 (= 1:5000)
К пробирке 12 добавить 0,01 (= 1:10000)

3. Подготовьте аналогичную серию культивирования в пробирках, пронумерованных последовательно с 13 по 18, и добавьте различные количества раствора формальдегида, а именно:

К пробирке № 13 добавить 1,0 у.е. (= 1:1000)
К пробирке № 14 добавить 0,4 у.е. (= 1:2500)
К пробирке № 15 добавить 0,2 у.е. (= 1:5000)
К пробирке № 16 добавить 0,1 у.е. (= 1:10000)
К пробирке № 17 добавить 0,075 у.е. (= 1:15000)
К пробирке № 18 добавить 0,05 у.е. (= 1:20 000)

4. Инкубируйте все три набора культур в оптимальных условиях с точки зрения температуры и атмосферы.

5. Исследуйте каждую из пробирок для культивирования изо дня в день, пока не истечет семь дней, и отметьте те пробирки, если таковые имеются, в которых происходит рост.

6. Из таких пробирок, в которых обнаружен рост, приготовьте субкультуры на подходящих средах и убедитесь, что организм, вызывающий рост, изначально использовался в тесте, а не является случайным загрязнением.

Низкий коэффициент летальности.—

Требуемое устройство:

Высококонцентрированные растворы дезинфицирующих средств.

Стерильные пробирки для разведения концентрированных растворов дезинфицирующих средств.

Подвесные горки.

Обложки.

Колба Эрленмейера, содержащая 100%-ную стерильную дистиллированную воду.

Коробка стерильных пипеток, 10 °с (в десятых долях кубического сантиметра).

Коробка стерильных пипеток, 1 куб.см (в десятых долях кубического сантиметра).

Способ.—

1. Подготовьте поверхностное культивирование "тестируемого" организма *B. anthracis* на питательном агаре в бутылке для культивирования и инкубируйте при оптимальных условиях в течение двадцати четырех часов; затем исследуйте культивирование под микроскопом, чтобы определить отсутствие спор.
2. Приготовьте растворы с разным процентным содержанием каждого дезинфицирующего средства.
3. Сделайте серию капельных препаратов из агаровой культуры, используя петлю с дезинфицирующим раствором разного процентного содержания для приготовления эмульсии на каждом покровном листе.
4. Исследуйте под микроскопом и отметьте самый сильный раствор, который не вызывает плазмолиз, и самый слабый раствор, который вызывает плазмолиз организма.
5. Сделайте контрольные приготовления этих двух растворов и определите процентное содержание, подлежащее тестированию.
6. Наберите пипеткой 10 мл стерильной воды во флакон для культивирования и приостановите в нем весь поверхностный рост.
7. Перелейте суспензию в колбу Эрленмейера и смешайте ее с оставшимся в колбе количеством стерильной воды 90°с.
8. Наберите пипеткой по 10 мл разведенной суспензии в каждую из десяти стерильных пробирок.
9. Наклейте на одну из пробирок надпись "Контрольная" и поместите ее в инкубатор при температуре 18°С.

10. Добавьте в каждую из оставшихся пробирок достаточное количество[11] концентрированного раствора дезинфицирующего средства для получения процентного содержания, определенного ранее (видео этап 5).
11. Инкубируйте пробирки при температуре от 18°C до 20°C.
12. С интервалом в час извлекайте контрольную пробирку и одну из пробирок с добавленным дезинфицирующим средством из инкубатора.
13. Сделайте субкультуру как из контрольной, так и из тестируемой суспензии на поверхности питательного агара; инкубируйте при оптимальных условиях.
14. Наблюдайте за этими культуральными пробирками изо дня в день до истечения семи дней и определите наименьшее воздействие, необходимое для того, чтобы вызвать гибель вегетативных форм.

Превосходный коэффициент летальности.—

1. Подготовьте поверхностное культивирование "тестируемых" организмов на питательном агаре в бутылке для культивирования и инкубируйте в оптимальных условиях в течение трех дней для образования их спор.
2. Перелейте эмульсию в стерильную пробирку и нагревайте в дифференциальном стерилизаторе в течение десяти минут при температуре 80 °C, чтобы уничтожить все вегетативные формы.
3. Используйте тот процентный раствор дезинфицирующего средства, который был определен в предыдущем эксперименте, и завершите исследования, как описано в нем, шаги с 7 по 14, увеличив интервал между посевом подкормок до двух, трех или пяти часов, если сочтете это целесообразным.

Примечание.—Если необходимо оставить микроорганизмы в контакте с сильным раствором дезинфицирующего средства на длительное время, необходимо использовать некоторые средства для удаления всех следов дезинфицирующего средства с бактерий перед переносом их в свежую питательную среду; в противном случае, хотя присутствие дезинфицирующего средства фактически и не уничтожается, оно может предотвратить их развитие и, таким образом, привести к ошибочному заключению. Следовательно, во всех бактерицидных экспериментах важно прежде всего определить коэффициент ингибирования используемого бактерицида. При обстоятельствах, упомянутых выше, обычно достаточно приготовить субкультуры в таком объеме жидкой питательной среды, который был бы достаточным для снижения концентрации бактерицида примерно до одной сотой процента ингибирования, предполагая, что весь объем посевного материала состоял из бактерицида той силы, которая использовалась в тесте. В некоторых случаях достаточно просто нейтрализовать бактерицид и сделать его инертным, промыв организмы каким-либо негермицидным раствором (таким, например, как сульфид аммония при использовании солей ртути в качестве бактерицида). Однако, если требуется удалить последние следы бактерицида, действуйте следующим образом:

1. Перелейте суспензию бактерий в стерильные центробежные пробирки; добавьте необходимое количество дезинфицирующего средства и оставьте его в контакте с бактериями на необходимый период.
2. Тщательно отфильтруйте надосадочную жидкость пипеткой; наполните пробирку стерильной водой и равномерно распределите осадок по всей жидкости.
3. Снова центрифугируйте, отцеживайте надосадочную жидкость пипеткой; наполните пробирку стерильной водой; равномерно распределите осадок по жидкости и перелейте суспензию в литровую колбу.
4. Доведите до литра, добавив стерильную воду; процедите суспензию через стерильную фарфоровую свечу.
5. Эмульгируйте остатки бактерий в 5-градусном стерильном бульоне.
6. Приготовьте необходимые субкультуры из этой эмульсии.

ПАТОГЕНЕЗ.

Живые бактерии.—

(а) Психрофильные бактерии: когда организм будет расти только при температуре от 18° С до 20°С или ниже,

1. Подготовьте культуры в питательном бульоне и инкубируйте в оптимальных условиях.
2. После семидневной инкубации введите такое количество культуры, которое соответствует 1 проценту. массы тела здоровой лягушки в спинной лимфатический мешок рептилии.
3. Наблюдайте до наступления смерти или, в случае отрицательного результата, до истечения двадцати восьми дней (*смотрите* Главу XVIII).
4. Если и когда наступит смерть, проведите тщательное посмертное обследование (*смотрите* Главу XIX).

(b) Мезофильные бактерии: Когда организм растёт при температуре от 35° до 37°С.,

1. Подготовьте культуры в питательном бульоне и инкубируйте при оптимальных условиях в течение сорока восьми часов.
2. Выберите двух белых мышей, как можно более похожих по возрасту, размеру и весу.
3. Привейте первой мыши подкожно у основания хвоста количество культивируемого вещества, эквивалентное 1 проценту. от веса его тела.
4. Инокулируйте вторую мышь внутрибрюшинно аналогичной дозой.
5. Внимательно наблюдайте до наступления смерти или по истечении двадцати восьми дней.
6. Если привитые животные умирают, проведите полное посмертное обследование.

Если смерть наступает вскоре после введения культивируемых бактерий, эксперименты с инокуляцией следует повторить два или три раза. Затем, если наблюдаемый организм неизменно проявляет патогенные эффекты, следует предпринять шаги для установления, по возможности, минимальной смертельной дозы (*вид ниже*) роста на твердой среде для лягушки или белой мыши соответственно. Другие подопытные животные — *например*, белая крыса, морская свинка и кролик - должны быть протестированы аналогичным образом.

7. Если привитые мыши не поражены, протестируйте действие рассматриваемого организма на белых крысах, морских свинках, кроликах и т.д.

Минимальная смертельная доза (m. l. d.); Если целью прививки является определение минимальной смертельной дозы, необходимо следовать несколько иной процедуре. Для этого и других точных экспериментов изготавливается специальная платиновая петля размером примерно 2,5 на 0,75 мм с параллельными сторонами, откалиброванная путем тщательного взвешивания для приблизительного определения количества влажных бактерий, которые сохраняются в петле при заполнении.

1. Культивирование должно быть подготовлено на твердой среде с оптимальной реакцией, инкубировано при оптимальной температуре и введено в период наибольшей активности конкретного организма, который требуется протестировать.
2. Разложите четыре стерильные капсулы в ряд и наклейте на них этикетки I, II, III и IV. В первую емкость с помощью стерильной градуированной пипетки налейте 10 г стерильного бульона, а в каждую из трех оставшихся - по 9,9 г
3. Удалите одну петельку бактериального роста с поверхности среды в пробирке для культивирования, соблюдая обычные меры предосторожности против загрязнения, и равномерно эмульгируйте ее с бульоном из первой капсулы. Каждый кубический сантиметр эмульсии теперь будет содержать одну десятую часть организмов, содержащихся в исходном количестве (пишется сокращенно 0.1 цикл).
4. Удалите 0,1 стакана эмульсии из первой капсулы с помощью стерильной градуированной пипетки, перенесите ее во вторую капсулу и тщательно перемешайте. Опустите зараженную пипетку в банку с раствором лизола. Это составляет основную массу жидкости во второй капсуле при температуре 10°С, и, следовательно, каждый кубический сантиметр бульона во второй капсуле содержит 0,001 петли.
5. Аналогичным образом 0,1 ч.л. смеси переносят из капсулы II в капсулу III (1 ч.л. бульона в капсуле III содержит 0,00001 петли), а затем из капсулы III в капсулу IV (1 ч.л. бульона в капсуле IV содержит 0,0000001 петли).

Полученные таким образом разведения могут быть сведены в таблицу;

Капсула I = 1 петля + 10 мл воды $\therefore$ 1 стакан = 0,1 мл.

Капсула II = 0,1 °с, капсула I + 9,9 °с воды $\therefore$ 1 °с = 0,001 лут.

Капсула III = 0,1 °с, капсула II + 9,9 °с воды $\therefore$ 1 °с = 0,00001 лут.

Капсула IV = 0,1 с.с. капсула III + 9,9 с.с. воды $\therefore$ 1 с.с. = 0,0000001 петли.

6. С помощью стерильных градуированных пипеток извлеките необходимое количество бульона, соответствующее различным десятикратным делителям петли, из соответствующих капсул, и перенесите каждую "дозу" в отдельную стерильную капсулу с этикеткой; и к таким дозам, которые невелики по объему, добавьте необходимое количество стерильного бульона, чтобы получилось до 1 ст.л.
7. Кратные петли готовят путем эмульгирования 1, 2, 5 или 10 петель в каждой с добавлением 1 ст.л. стерильного бульона в отдельных стерильных капсулах.
8. Сделайте прививку серии животных этими отмеренными дозами, наполняя шприц сначала из капсулы, содержащей наименьшую дозу, затем из капсулы, содержащей следующую наименьшую дозу, и так далее. При соблюдении осторожности не возникнет необходимости стерилизовать шприц во время серии прививок.
9. Поместите в пробирки желатин или агар, разжиженные при нагревании, каждого из более высоких разведений, скажем, от 0,0000001 петли до 0,01 петли; разлейте по тарелкам и инкубируйте. Когда рост заметен, подсчитайте количество микроорганизмов, присутствующих в каждом из них, усредните и рассчитайте количество бактерий, присутствующих в одной петле инокулята.
10. Наименьшая доза, вызывающая инфекцию и гибель привитого животного, отмечается как минимальная летальная доза.

Токсины.—

Готовят культивирование исследуемого организма в формиатном бульоне с глюкозой и инкубируют в течение четырнадцати дней при оптимальных условиях.

а) Внутриклеточные или нерастворимые токсины:

1. Нагревайте жидкую культуру на водяной бане при температуре 60°C в течение тридцати минут. (О полученной стерильной мутной жидкости часто говорят как об "убитой" культуре)
2. Наполните пробирку стерильным бульоном в таком же количестве и инкубируйте при оптимальных условиях. Этот "контроль" затем служит для демонстрации отсутствия токсина в живых бактериях.

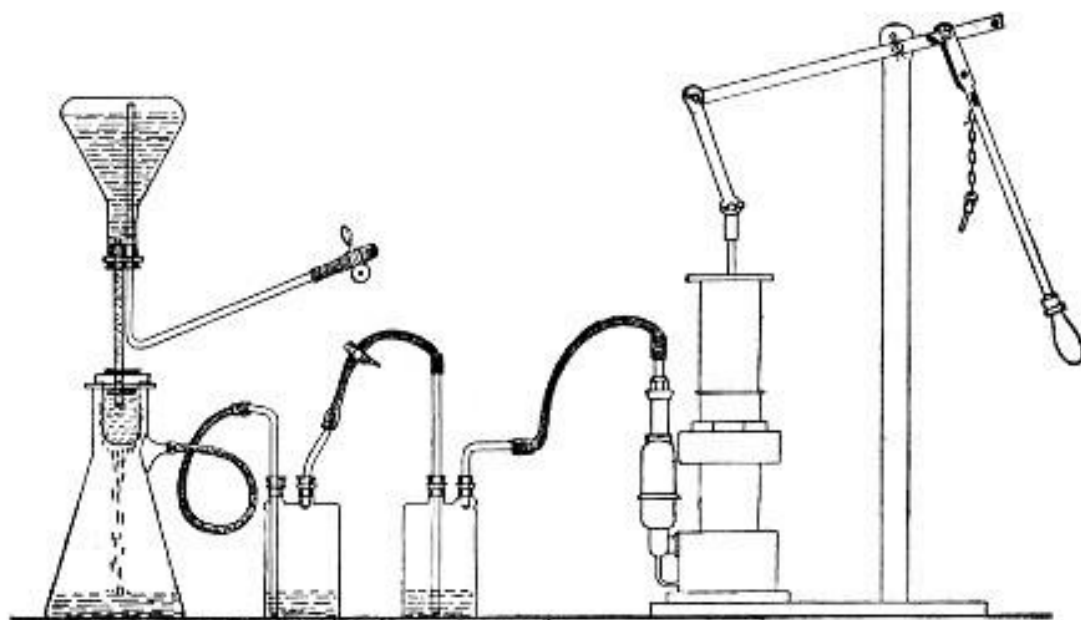


Рис.

160. Устройство для фильтрации токсинов.

3. Введите внутривенно такое количество культивируемого вещества, которое соответствует 1 проценту. от массы тела выбранного животного, обычно одного из мелких грызунов.

4. Наблюдать в течение жизни или до истечения двадцати восьми дней, а в случае смерти, наступившей в течение этого периода, провести полное посмертное обследование.

5. Повторите эксперимент хотя бы один раз. В случае положительного результата оцените минимальную смертельную дозу "убитой" культуры для каждого из видов животных, над которыми проводились эксперименты.

(b) Внеклеточные или растворимые токсины:

1. Процедите культивирование через фарфоровую фильтровальную свечу (Berkefeld) в стерильную фильтровальную колбу, расположив устройство так, как показано на прилагаемом рисунке (рис. 160).

2. Привейте мышам, крысам, морским свинкам и кроликам подкожно количество токсина, соответствующее 1 проценту. от массы тела каждого соответственно и наблюдать, при необходимости, до истечения одного месяца.

3. Инокулируйте "контрольную" пробирку бульона аналогичным количеством и инкубируйте, чтобы определить, отделен ли отфильтрованный токсин от живых бактерий.

4. В случае летального исхода проведите полное и тщательное посмертное обследование.

5. Повторите эксперименты и, если результаты окажутся положительными, определите минимальную смертельную дозу токсина для каждого из восприимчивых животных.

Оценка массы токсина проводится по методикам, аналогичным тем, которые установлены для живых бактерий (видео, стр. 316), с простой заменой 1 куб.см токсина в качестве единицы измерения вместо единицы "цикла" живой культуры.

В ходе случайных исследований часто случается так, что для анализа на токсин доступна культура из бульонной пробирки, а из колбы - нет. В таких случаях неоценимы небольшая фильтрующая свеча и трубка Мартина (рис. 161), специально разработанные для фильтрации небольших количеств жидкости. Он состоит из узкой фильтровальной колбы, достаточно большой, чтобы вместить обычную пробирку размером 18 × 2 см. Горловина трубчатой свечи Chamberland размером 15 × 1,5 см закрыта перфорированной резиновой пробкой, в которую вставляется конец стержня воронки с головкой из чертополоха, в то время как непосредственно под торцом воронки расположена резиновая пробка, закрывающая горловину фильтровальной колбы. Когда устройство зафиксировано на месте и подсоединено к вытяжному насосу, культивированный материал заливается в головку воронки, и благодаря относительно большой фильтрующей поверхности фильтрат без зародышей быстро всасывается в приемник для пробирок.

Повышение вирулентности организма.—Если требуется повысить или "возвысить" вирулентность слабопатогенного организма, необходимы специальные методы прививки, тщательно подобранные с учетом требований каждого отдельного случая. К числу наиболее важных относятся следующие:

1. *Распространение вируса.*—Прививка чистых культур организма высокочувствительным животным и передача его как можно быстрее от животного к животному, всегда выбирая тот метод прививки -*например*, внутрибрюшинный, — который создает организму наиболее благоприятные условия для его роста и размножения.

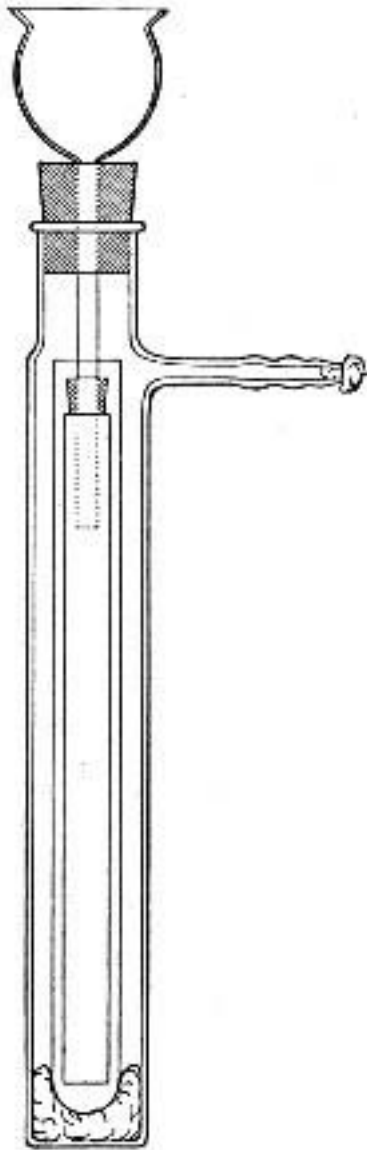


Рис. 161—Фильтрующий аппарат Мартина для небольших

количеств жидкости.

2. *Вирус плюс вирулентные организмы.*— Прививка чистых образцов организма вместе с чистыми образцами какого-либо другого микроба, который сам по себе достаточно вирулентен, чтобы обеспечить гибель экспериментального животного, либо в той же ситуации, либо в какой-либо другой части тела. Благодаря этой ассоциации организм с низкой вирулентностью часто приобретает более высокую степень вирулентности, которая может быть еще более повышена с помощью "пассажей" (см. выше).

3. *Вирус плюс токсины.*— Прививка чистых культур организма в определенную выбранную ситуацию вместе с подкожной, внутрибрюшинной или внутривенной инъекцией токсина — например, одного из тех, что разработаны группой proteus, — одновременно с инъекцией, до или сразу после нее слабого вируса. Таким образом, естественная сопротивляемость животного снижается, и привитый организм получает возможность размножиться и оказывать свое патогенное действие, его вирулентность впоследствии повышается с помощью "пассажей".

Ослабление вирулентности организма.—Ослабление или понижение вирулентности патогенного микроба обычно достигается с гораздо меньшими трудностями, чем повышение его вирулентности, и обычно достигается путем изменения условий культивирования, как, например:

1. Культивирование в таких средах, которые не подходят по причине их состава (*a*) или (*b*) реакции.
2. Выращивание на подходящих средах, но при неподходящей температуре.
3. Выращивание на подходящих средах, но в неподходящей атмосфере.
4. Выращивание в подходящих средах, но при неблагоприятных условиях освещения, движения и т.д.

Ослабление действия вируса также может быть обеспечено с помощью

5. Прохождение через животных с естественной устойчивостью.
6. Подверженность иссушению.
7. Воздействие газообразных дезинфицирующих средств.
8. С помощью комбинации двух или более из вышеперечисленных методов.

ИММУНИЗАЦИЯ.

Дальнейшее изучение патогенетических способностей любой конкретной бактерии включает активную иммунизацию одного или нескольких ранее нормальных животных. Эта цель может быть достигнута различными средствами; но следует помнить, что иммунизация проводится не по какому-либо жесткому правилу или только одним методом, а обычно комбинацией методов, адаптированных к требованиям каждого конкретного случая. Обычные методы включают:

A. Активная иммунизация.

I. Путем инокуляции мертвыми бактериями (*т.е.*, бактерии, убитые нагреванием; действием ультрафиолетовых лучей, химических бактерицидов или путем автолиза).

II. Путем инокуляции ослабленных штаммов бактерий.

III. Путем инокуляции живых вирулентных бактерий (при необходимости повышенной вирулентности).

B. Комбинированная активная и пассивная иммунизация:

IV. Путем инокуляции смесями токсин-антитоксин.

АКТИВНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ.

Иммунизация кролика против *Diplococcus pneumoniae* может быть приведена в качестве примера общих методов иммунизации лабораторных животных.

1. Возьмите взрослого кролика весом не менее 1200-1500 граммов (крупные кролики весом 2000 граммов и старше наиболее подходят для экспериментов по иммунизации). Внимательно следите за весом и температурой в течение нескольких дней, описанных в следующих шагах.

2. Привейте маленькому кролику внутрибрюшинно одну или две капли суточной выдержки на кровяном агаре *вирулентного* штамма *Diplococcus pneumoniae*.

Смерть должна наступить в течение двадцати четырех часов и в любом случае не будет отложена более чем на сорок восемь часов.

3. При вскрытии, соблюдая меры предосторожности, перелейте петлю сердечной крови в колбу Эрленмейера, содержащую 50-градусный стерильный питательный бульон. Инкубировать при температуре 37° С в течение двадцати четырех часов.

4. Приготовьте также несколько культур кровяного агара из сердечной крови кролика, пометьте их все ОК (исходная культура). После двадцатичетырехчасовой инкубации при 37 ° С. наденьте колпачок из индийской резины на закупоренное горлышко пробирки со всеми этими культурами, кроме одной, и покрасьте колпачок канадским бальзамом или шеллаковым лаком, высушите и поставьте обратно в горячий инкубатор.

Это предотвратит испарение, и запечатанные таким образом культуры сохраняют вирулентность неизменной в течение значительного времени.

5. Произведите свежее субкультивирование на кровяном агаре после культивирования без крышки на О.С. и после двадцатичетырехчасовой инкубации при 37 ° С. определите минимальную смертельную дозу этого штамма для серии мышей (см. стр. 316).

6. Подвесьте колбу с бульонной культурой двадцатичетырехчасовой выдержки (этап 3) на водяной бане при температуре 60°С на один час. Быстро охладите колбу под струей холодной воды.

7. Определите стерильность этого (?) уничтоженного культивирования, поместив по одному кубическому сантиметру питательного бульона в каждую из нескольких пробирок и инкубируйте при 37 ° С в течение двадцати четырех часов. Если происходит рост *Diplococcus pneumoniae*, снова нагревайте культуру на водяной бане при температуре 60 ° С в течение одного часа и снова проверяйте на стерильность.

8. Введите выбранному кролику внутривенно (см. стр. 363) 2 ст. л. убитого культивируемого материала и введите еще 10 ст. л. в брюшную полость.

В течение следующих нескольких дней животное немного потеряет в весе и, возможно, у него появится некоторая гипертония.

9. Когда температура и вес снова придут в норму - обычно примерно через семь дней после прививки — снова вводят убитую культуру, на этот раз вводя дозу 5 °с внутривенно и 20 °с внутрибрюшинно. Вероятно, будет наблюдаться реакция температуры и веса, аналогичная реакции после первой инъекции, но менее выраженная, чем после первой, но примерно через недельный интервал животное будет готово к следующей инъекции.

10. Когда будете готовы к третьей инъекции, приготовьте субкультуру свежего кровяного агара из другой операционной пробирки и после двадцатичетырехчасовой инкубации приготовьте минимальную смертельную дозу (как определено в 5) и введите ее подкожно в брюшную стенку кролика.

Вероятно, будет наблюдаться небольшая местная реакция, а также реакции на вес и температуру.

11. Через неделю-десять дней введите аналогичную минимальную смертельную дозу в брюшную полость.

12. Очень тщательно следите за весом и температурой кролика и, регулируя сроки прививки в зависимости от общего состояния животного, продолжайте вводить живые культуры пневмококка в брюшную полость, постепенно увеличивая дозу, кратную десяти.

13. С интервалом в два месяца могут быть взяты образцы крови из задней ушной вены и сыворотка проверена на наличие специфических антител.

14. При благоприятных условиях примерно через шесть месяцев постоянной работы будет обнаружено, что кролику можно вводить внутрибрюшинно культивированный агар из цельной крови без каких—либо видимых побочных эффектов; и эта характеристика — устойчивость к смертельному воздействию больших доз вируса - является единственным критерием *иммунитета*. Кроме того, сыворотка, выделенная из крови, взятой у животного примерно через неделю после инъекции, при использовании в дозах 0,01 у.е. защитит мышь от летального воздействия по меньшей мере десяти минимальных летальных доз живых пневмококков.

В приведенной выше иллюстрации предполагалось, что подопытному кролику был присвоен полный приобретенный активный иммунитет в результате образования антител, специфичных к *diplococcus pneumoniae*, в количестве, достаточном для обеспечения уничтожения огромных доз живых кокков — *антигена* (то есть вещества, введенного в ответ на которое было выработано *антитело*), в данном конкретном случае представляющего собой бактериальную протоплазму пневмококка с его эндотоксинами.

Но при условии, что смерть не наступает сразу после введения антигена, специфическое антитело всегда образуется в большем или меньшем количестве; и в экспериментальных работах достаточное количество любого требуемого антитела часто может быть получено без доведения процесса иммунизации до его логического завершения.

Например, если иммунизация кролика против *Bacillus typhosus* начата по уже изложенным линиям, то после нескольких инъекций "убитого" культивирования часто обнаруживается, что сыворотка крови животного (даже разбавленная физиологическим раствором, в несколько сотен раз превышающим его объем) содержит специфический агглютинин против *B. typhosus* — и если единственной целью эксперимента было получение агглютинина, прививки вполне могут быть прекращены на этом этапе, хотя животное еще не обладает иммунитетом в строгом смысле этого слова.

Опять же, антитела могут образовываться в ответ на антигены, отличные от инфекционных частиц — таким образом, введение подходящим животным чужеродных белков, таких как яичный альбумин, гетерологичные сыворотки крови или красные кровяные диски от другого

вида животных, приведет к образованию специфических антител, обладающих определенным сродством к их соответствующим антигенам.

Наиболее важным антителом этого последнего типа является гомолизин, вещество, которое появляется в сыворотке крови животного, предварительно введенной с отмытыми клетками крови животного другого вида. Сыворотка от такого животного обладает способностью разрушать красные кровяные диски разновидности, используемой в качестве антигена, и вызывать выделение содержащегося в них гемоглобина, а также специфична по своему действию до такой степени, что не оказывает какого-либо вредного воздействия на красные кровяные тельца любого другого вида животных.

Действие этой сыворотки обусловлено наличием двух различных телец, комплемента и гомолизина.

Комплемент (или *алексин*) представляет собой термолабильное, легко окисляющееся вещество, присутствующее в различных, но неизменяемых количествах в нормальной сыворотке крови каждого животного. Это вещество, которое оказывает литическое действие на все инородные вещества, попадающие в кровь или ткани; но само по себе является сравнительно инертным телом и способно оказывать максимальное литическое действие только в присутствии и в комбинации со специфическим антителом или иммунным органом.

Комплемент получают (не смешанный с антителом) путем сбора свежей сыворотки крови у любого здорового нормального (то есть некулированного) животного. Для экспериментальных работ чаще всего используется сыворотка морских свинок.

Гомолизин (иммунное тело, связка, сенсibiliзирующее тело, амбоцептор) представляет собой *термостабильное* антитело, образующееся в ответ на инъекцию эритроцитов, которое, хотя само по себе инертно, способно связывать комплемент, присутствующий в нормальной сыворотке, с эритроцитами той разновидности, которая используется в качестве антигена — комбинация, приводящая к гемолизу.

Гомолизин получают путем сбора свежей сыворотки крови у соответствующим образом привитого животного и воздействия на нее температуры 56 ° C (для разрушения термолабильного комплемента) в течение 15-30 минут перед использованием. Затем он называется *инактивированным* и *реактивируется* добавлением свежей нормальной сыворотки, то есть сыворотки, содержащей комплемент.

Гомолизин важен в академическом плане благодаря тому факту, что с его помощью были выяснены многие проблемы иммунитета; но его нынешнее практическое значение заключается в применении *гемолитической системы* (то есть гомолизина, соответствующего раствора эритроцитов и комплемента) к определенным лабораторным методам, имеющим своей целью либо идентификацию инфекционного объекта, либо диагностику наличия инфекции.

Для использования в этих лабораторных методах диагностики наиболее удобно готовить гемолитическую сыворотку, специфичную для крови человека, независимо от того, является ли лаборатория изолированной или присоединена к крупной больнице. Однако вместо этого можно использовать кровь быка, овцы или козы, если ее легко достать, и хотя следующий метод предназначен для получения человеческого гомолизина, во всех случаях применяется одна и та же процедура.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ.

Требуемое устройство:

Небольшая центрифуга, предпочтительно с электрическим приводом, с двумя емкостями для пробирок и закрытая защитным экраном (рис. 162).

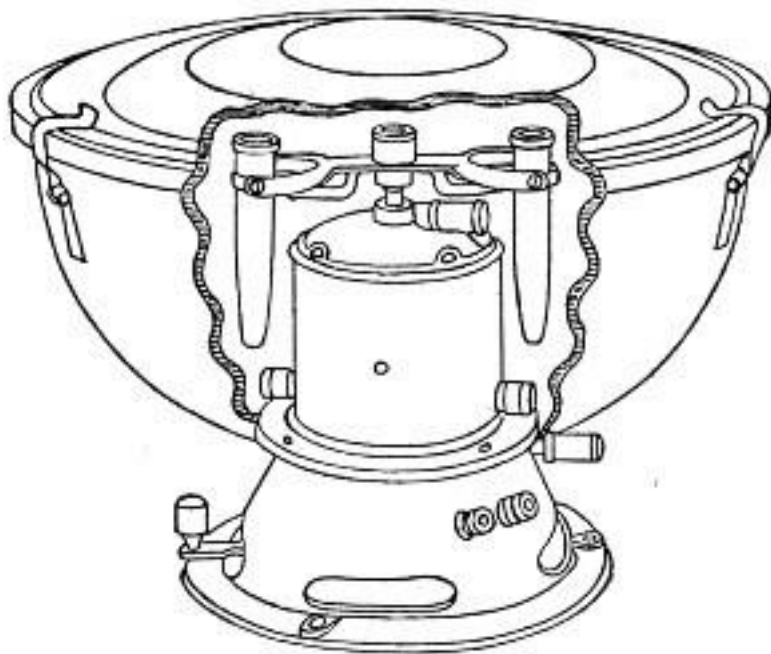
Стерильные центрифужные пробирки (емкостью 10 куб.см), рис. 163.

Стерильные пипетки (с градуировкой 10 °с) в футляре.

Стерильные стеклянные капсулы (в футляре).

Стерильные пробирки.

Стерильный цельностеклянный шприц (емкостью 5 или 10 куб. см) и игла.



центрифуга.

Рис. 162. Небольшая электрическая



Рис. 163—Центрифужная пробирка.

Необходимые реагенты:

Физиологический раствор.

10%. раствор цитрата натрия в физиологическом растворе.

Человеческая кровь (*видео ниже*).

Способ.—

1. Выберите здорового взрослого кролика весом не менее 2500 граммов в соответствии с уже приведенными инструкциями (стр. 322) и подготовьте его к внутрибрюшинной прививке.
2. Отмерьте 2 ст.л. цитратированной человеческой крови (взятой во время хирургической операции или венозной резекции, или взятой венопункцией из средней базальной или срединно-головной вены взрослого человека) в центрифужную пробирку и тщательно центрифугируйте.
3. Промыть три раза обычным физиологическим раствором (*смотрите также стр. 388*).

4. Перенесите промытые клетки в стерильную капсулу с помощью стерильной пипетки. Добавьте 5 ст.л. физиологического раствора и тщательно перемешайте.
5. Наберите смесь клеток и физиологического раствора в цельностеклянный шприц и сделайте инъекцию в брюшную полость кролика.
6. Через семь дней внутрибрюшинно ввести отмытые клетки из 5-градусной крови человека, смешанной с 5-градусным физиологическим раствором.
7. Через семь дней введите отмытые клетки из 10-градусной человеческой крови, смешанной с 5-градусным физиологическим раствором.
8. Еще через семь дней повторите инъекцию отмытых клеток из 10-градусной человеческой крови, смешанной с 5-градусным физиологическим раствором.

Примечание.—Лучшие результаты достигаются, если вторая и последующие инъекции делаются внутривенно, даже когда используются меньшие количества отмытых эритроцитов. Если, однако, выбран способ внутривенного введения, необходимо проявлять чрезмерную осторожность, чтобы избежать попадания воздуха в вену — несчастный случай, за которым в течение нескольких минут следует смерть кролика от тромбоэмболии легочной артерии.

9. Дайте пройти пяти дням, затем возьмите предварительный образец крови, скажем, около 2 мл, из уха кролика. Дайте ему свернуться, отделите сыворотку и перелейте в стерильную пробирку. Поместите пробирку на водяную баню при температуре 56°C на пятнадцать минут (для инактивации) и проведите количественный анализ сыворотки на гемолитические свойства следующим образом:

ТИТРОВАНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ.

Требуемое устройство:

Электрическая центрифуга.
Стерильные центрифужные пробирки.
Водяная баня регулируется при температуре 56 °C.
Стерилизованные пипетки 10 °C. градуировка в десятых долях.
Стерилизованные пипетки с градуировкой в десятых долях на 1 градус.
Стерильные пробирки, 16 × 2 см.
Маленькие стерильные пробирки, 9 × 1 см.
Небольшая подставка для пробирок или рулон пластилина.
Капиллярные сосковые пипетки.
Прочная резиновая лента или отрезок небольшой резиновой трубки.

Необходимые реагенты и способ приготовления:

1. Обычный физиологический раствор.
2. Гемолитическая сыворотка, инактивированная предварительным нагреванием до 56°C в течение 15 минут (см. выше) в пробирке с маркировкой **H.S.**
3. Дополнение. Свежая сыворотка морской свинки в пробирке с маркировкой **C.**

Убейте обычную морскую свинку парами хлороформа.

Вскройте грудную клетку со всеми мерами предосторожности и соберите как можно больше крови из сердца стерильной пастеровской пипеткой.

Перелейте его в стерильную центрифужную пробирку и поместите пробирку в инкубатор при температуре 37°C. Через два часа отделите сгусток от стенок пробирки и тщательно отрифугируйте.

Перелейте прозрачную сыворотку пипеткой в чистую стерилизованную пробирку.

4. Раствор эритроцитов в пробирке с маркировкой E.

Соберите и промойте эритроциты человека (см. стр. 388, 1-8). Измерьте объем имеющихся эритроцитов и приготовьте 2-процентный раствор. суспензия в физиологическом растворе.

Способ.—

1. Возьмите две пробирки, пронумеруйте их 1 и 2 и наберите пипеткой по 9 мл физиологического раствора в каждую.

2. Добавьте 1 ч.л. гемолитической кроличьей сыворотки в пробирку № 1 и тщательно перемешайте: возьмите 1 ч.л. смеси и добавьте ее в пробирку № 2; тщательно перемешайте.

3. Поместите десять маленьких пробирок в подставку для пробирок или в рулон пластилина, пронумеруйте от 1 до 10.

4. Пипеткой в пробирку № 1 0,5 ч.л. = 0,5 ч.л. гемолитической сыворотки} Из пробирки H. S.
Пипеткой в пробирку № 2 0,1 ч.л. = 0,1 ч.л. гемолитической сыворотки}

Пипеткой в пробирку № 3 0,5 у.е. = 0,05 у.е. гемолитической сыворотки} Из пробирки 1.
Пипеткой в пробирку № 4 0,3 у.е. = 0,03 у.е. гемолитической сыворотки}
Пипеткой в пробирку № 5 0,2 у.е. = 0,02 у.е. гемолитической сыворотки}
пипеткой в пробирку № 6 0,1 у.е. = 0,01 у.е. гемолитической сыворотки}

Пипеткой в пробирку № 7 0,5 у.е. = 0,005 у.е. гемолитической сыворотки} Из пробирки 2.
Пипеткой в пробирку № 8 0,3 у.е. = 0,003 у.е. гемолитической сыворотки}
Пипеткой в пробирку № 9 0,2 у.е. = 0,002 у.е. гемолитической сыворотки}
Пипеткой в пробирку № 10 0,1 у.е. = 0,001 у.е. гемолитической сыворотки}

5. В каждую пробирку добавьте по 1 ч.л. раствора эритроцитов.

6. При необходимости (то есть в пробирках 2, 4, 5, 6, 8, 9 и 10) добавьте обычный физиологический раствор к смеси в пробирках, пока столб жидкости в каждой не достигнет одинакового уровня.

7. Встряхните по очереди каждый тюрбик, чтобы тщательно перемешать его содержимое. Заткните горловину каждой пробирки ватой и поместите весь набор в инкубатор при температуре 37 ° C на один час.

8. Извлеките пробирки из инкубатора и наберите в каждую пробирку пипеткой по 0,1 стакана комплемента (сыворотки морской свинки) и снова поставьте пробирки в инкубатор при температуре 37 °C еще на один час.

9. Извлеките пробирки из инкубатора и, если не во всех пробирках произошел полный гемолиз, постоит на одной стороне, предпочтительно в холодильнике, в течение часа.

10. Затем осмотрите пробирки.

О полном гемолизе свидетельствует наличие прозрачного красного раствора без отложения эритроцитов на дне пробирки.

Об отсутствии гемолиза свидетельствует наличие прозрачной или мутной бесцветной жидкости с отложениями эритроцитов на дне пробирок.

Наименьшее количество гемолитической сыворотки, вызвавшее полный гемолиз, известно как минимальная гемолитическая доза (*M.H. D.*), и если гемолиз произошел во всех пробирках вплоть до № 7, то *m. h. d.* этой конкретной сыворотки составляет 0,005 у.е. = 200 минимальным гемолитическим дозам на кубический сантиметр. Такая сыворотка достаточно сильна для экспериментальной работы; действительно, для многих целей полный гемолиз вплоть до пробирки 6 укажет на достаточно сильную сыворотку (= 100 м. ч. сут. на кубический сантиметр). Если, однако, только первые одна или две пробирки полностью гемолитизированы, это указывает на то, что кролику следует делать дальнейшие инъекции, чтобы повысить гемолитическую силу до достаточно высокого уровня.

ХРАНЕНИЕ ГОМОЛИЗИНА.

Если и когда содержание гомолизина в сыворотке крови кролика окажется достаточным, уничтожьте животное парами хлороформа.

С соблюдением мер асептики удалите как можно больше крови из сердца в стерилизованные центрифужные пробирки.

Перенесите пробирки с кровью в инкубатор при температуре 37°C на два часа, затем тщательно центрифугируйте.

Отцеживайте пипеткой прозрачную сыворотку и заливайте в количестве 1 ст.л. в маленькие стеклянные ампулы или пипетки и герметично закрывайте в пламени паяльной трубки, соблюдая осторожность, чтобы сыворотка не подгорела.

Ампулы, наполненные сывороткой и запечатанные, поместите на водяную баню при температуре 56 ° C на 30 минут. Это разрушает комплемент, т.е. инактивирует сыворотку и в то же время, при условии, что различные операции проводились с соблюдением асептических мер предосторожности, обеспечивает ее стерильность. Более длительное воздействие снижает гемолитическую силу.

Поместите ампулы в закрытую металлическую коробку и храните в холодильнике для дальнейшего использования.

СНОСКИ:

[10] Приведенные здесь количества не совсем верны. Если важна точность, учащийся должен рассчитать требуемую сумму с помощью процентной формулы, Приложение, стр. 496.

[11] Смотрите процентную формулу, Приложение, страница 496.

XVII. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ИНОКУЛЯЦИЯ ЖИВОТНЫХ.

Использование живых животных для экспериментов по прививке может стать необходимой процедурой в Бактериологической лаборатории по одной или нескольким из следующих причин:

A. Определение патогенетических свойств бактерий, уже выделенных в чистой культуре (см. стр. 315).

Точное изучение условий, влияющих на вирулентность (включая ее поддержание, усиление и ослабление) организма, и точные наблюдения за патогенными эффектами, вызываемыми ее проникновением в ткани организма и размножением в них, очевидно, могут быть проведены только с помощью экспериментальной инокуляции; в то время как многие моменты, относящиеся к жизнеспособности, долголетию и т.д., могут быть наиболее легко выяснены с помощью таких экспериментов.

B. Выделение патогенных бактерий.

Определенные высокопаразитарные бактерии (которые с трудом растут на искусственных средах лаборатории) могут быть выделены из ассоциированных сапрофитных бактерий только со значительными трудностями, когда используются только культуральные методы; но если животному, чувствительному к действию первых, ввести смесь паразита и сапрофитов, патогенный организм может быть легко выделен из тканей инфицированного животного. Пневмококк, например, встречается в мокроте пациентов, страдающих острой крупозной пневмонией, но обычно в ассоциации с различными сапрофитами, происходящими из полости рта и глотки. Оптимальная среда для роста пневмококка, кровяной агар, также является отличной пищей для сапрофитов полости рта, и культуры пластинок быстро обрастают ими, что приводит к уничтожению более деликатного пневмококка. Но инокулируйте немного мокроты под кожу мыши, и через три-четыре дня пневмококк попадет в кровоток (оставив сапрофиты в месте инокуляции) и убьет животное. Культивирование, произведенное при вскрытии (см. стр. 398) из крови сердца мыши, даст чистый рост пневмококка.

C. Идентификация патогенных бактерий.

Сходство, морфологическое и культурное, существующее между определенными патогенетическими бактериями, в некоторых случаях настолько велико, что полностью

перекрывает различия; опять же, одна и та же бактерия может при различных условиях принимать внешний вид, настолько отличный от тех, которые считаются типичными или нормальными, что ставит под сомнение ее идентичность. В каждом случае простой эксперимент с прививкой может сразу решить проблему. В качестве конкретного примера можно привести вскрытие животного, умершего от неизвестной инфекции. Культивирование из сердечной крови дало чистый рост типичного (капсулированного) пневмококка. Культивирование из печени дало чистый рост того, что, по-видимому, было типичным (некапсулированным) *Streptococcus pyogenes longus*. Последний, инокулированный кролику, вызвал смерть животного от пневмококковой септицемии, а культуры из крови кролика дали чистый рост типичного (капсулированного) пневмококка.

D. Изучение проблем иммунитета.

Только тщательное и детальное изучение поведения животной клетки и жидкостей организма по отношению к инфицирующей бактерии позволяет пролить свет на сложную проблему, при которой клетка противодействует успешному сопротивлению распространению вторгшегося микроба или преуспевает в вытеснении микроба впоследствии возникновения этого распространения.

Однако в данный момент наше внимание приковано к первому из этих общих разделов, поскольку именно применение знаний, полученных в ходе его изучения, позволяет нам решать проблемы, возникающие в рамках любого из остальных.

С какой бы целью ни проводилась прививка, важно, чтобы эксперимент был спланирован таким образом, чтобы получить максимальное количество информации и минимум дискомфорта для используемого животного. Поэтому необходимо соблюдать все меры предосторожности, чтобы гарантировать, что вирус будет введен именно в выбранную ткань или орган; а сама операция должна быть проведена квалифицированно и быстро и в строго асептических условиях.

В ходе исследований прививки можно встретить множество примеров естественного иммунитета, как расового, так и индивидуального; но следует помнить, что естественный иммунитет является только относительным и никогда не абсолютным, и следует проявлять осторожность, чтобы не маркировать организм как *непатогенный* до тех пор, пока на разных видах животных не будет проведено множество различных методов прививки, комбинируемых при необходимости с различными процедурами, рассчитанными на преодоление любого видимого иммунитета, и неизменно дающих отрицательные результаты.

В некоторых странах эксперименты на животных разрешены только по прямой лицензии правительства, и то только в помещениях, специально лицензированных для этой цели. В Англии эта лицензия выдается министром внутренних дел и дает разрешение на проведение экспериментов на животных под общим наркозом при условии, что после завершения эксперимента животное должно быть уничтожено до прихода в сознание. Если предполагается проведение простых подкожных прививок и поверхностных вен, в дополнение к лицензии необходимо получить сертификат A, дающий это конкретное разрешение и исключающий необходимость общего обезболивания; whilst if the inoculation entails more extensive operative procedures, and it is necessary to observe the subsequent course of the infection, should such occur, the license must be *coupled with Certificate B*, поскольку этот сертификат устраняет принуждение к уничтожению животного под наркозом. Дополнительные специальные сертификаты и

комбинации сертификатов требуются, если кошки, собаки, лошади, ослы или крупный рогатый скот должны быть объектами эксперимента. В каждом сертификате прямо указано, что, если животное проявляет признаки боли, оно должно быть немедленно уничтожено.

При изучении патогенных свойств различных микроорганизмов обычно используются следующие животные:

<i>Хладнокровный.</i>	<i>Теплокровный.</i>	<i>Горячекровный.</i>
Лягушка.	Мышь.	Домашняя птица.
Жаба.	Крыса.	Голубь.
Ящерица.	Морская свинка.	
	Кролик.	
	Обезьяна.	

Подготовка.—Перед прививкой следует тщательно обследовать экспериментальных животных, чтобы избежать риска использования уже больных: поскольку необходимо помнить, что в естественных условиях, а также в неволе животные, используемые для лабораторных прививок, подвержены заражению различными паразитами животного и растительного происхождения, и в некоторых случаях такая инфекция не проявляет симптомов, очевидных при поверхностном осмотре; следует указать пол, измерить вес и ректальную температуру. Остальные важные моменты - это время прививки, материал, который прививается, и метод прививки, и, наконец, под каким руководством проводится эксперимент. В лаборатории автора эти данные заносятся на розовую карточку, которая является частью картотечной системы. На карточке также предусмотрено место для записей о ходе возникшей инфекции, а на обратной стороне приведена таблица веса и температуры (рис. 164 и 165).

INOCULATION CARD.		Laboratory No.
Date	o'clock..... m.	
Animal	No. in Series	♂ ♀
Weight	Temp.	
Character and Dose of Inoculum.		
Method of Inoculation.		Under Certificate.
Notes on Course of Infection.		
Result.		Signed

Рис. 164. Лицевая

сторона карты прививок.

Предварительный осмотр и освидетельствование. Предварительный осмотр должен включать наблюдение за животным в состоянии покоя и в движении; внешний вид шерсти, перьев или чешуи, осмотр глаз и наружных отверстий тела; тактильный осмотр тела и конечностей, пальпацию паха и живота; и во многих случаях микроскопическое исследование свежих и окрашенных пленок крови.

Можно кратко упомянуть некоторые из наиболее распространенных форм естественно приобретенной инфекции, не затрагивая, однако, различных блох, вшей и клещей, которые иногда поражают обычных лабораторных животных.

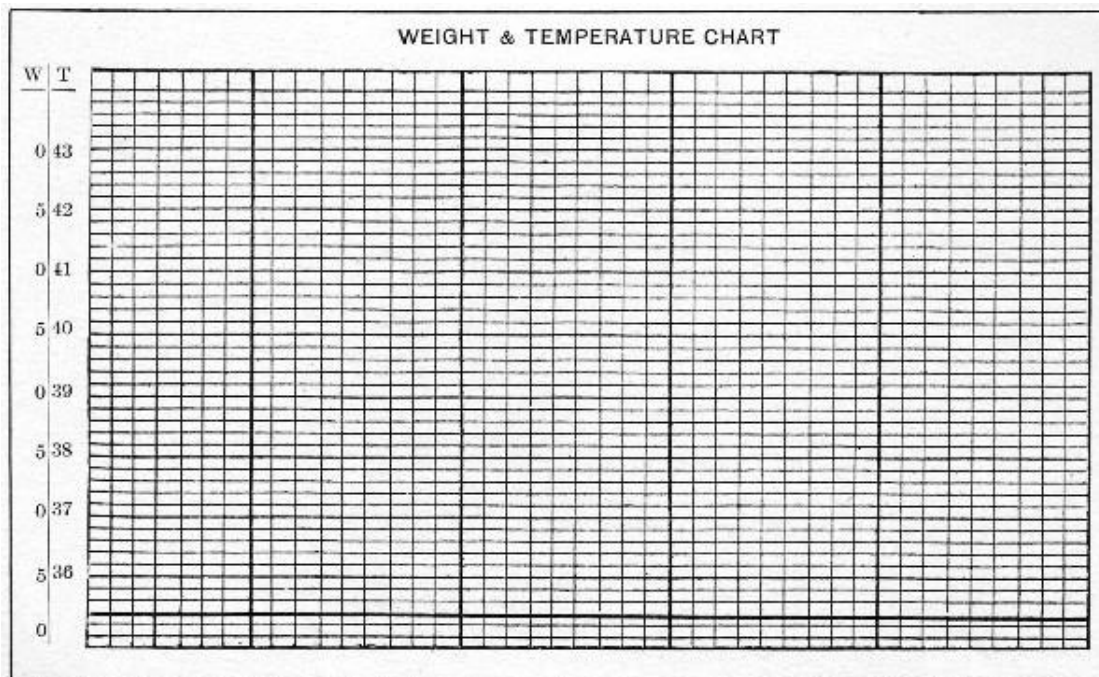


Рис. 165. Обратная

сторона прививочной карточки.

Кролик, особенно в неволе, подвержен атакам псориаза, и инфекция легко передается кроликам в соседних клетках, а также морским свинкам, но не крысам и мышам. Один вид (*Sarcoptes minor* var. *cuniculi*) дает начало чесотке обыкновенной. Инфекция сначала проявляется в виде толстых желтоватых чешуек и корок вокруг носа, рта и глаз, распространяется на основания и наружные поверхности ушей (никогда на внутреннюю поверхность ушных раковин), на передние и задние лапы, в пах и вокруг гениталий. Наличие акари может быть легко продемонстрировано микроскопически в соскобах кожи, обработанных калиевым раствором. Другая форма чесотки (вызываемая *Psoroptes communis cuniculi*) начинается на дне раковины, которая заполнена беловато-желтыми массами, состоящими из засохших корок, чешуек, наростов и мертвых акари. Основание уха твердое и опухшее, и поднятие животного за уши — как это обычно делается — вызывает сильную боль; действительно, этот симптом может быть первым, который привлекает внимание к инфекции, вызывающей прогрессирующее истощение и заканчивающейся смертью. Иногда наблюдается смешанная инфекция — саркоптоз плюс псоротический акариоз.

Если решено попытаться спасти животных, страдающих от заражения этими паразитами, их необходимо изолировать, тщательно очистить зараженные участки от струпьев и промыть оголенные поверхности 5%-ным раствором. раствор персульфата калия (нескольким каплям

дают стечь в раковину) или препарат, содержащий равные части мягкого парафина и вазелина с добавлением нескольких капель лизола. Эту обработку следует повторять ежедневно до тех пор, пока акару не будет уничтожен и животное не восстановит свое нормальное состояние. Клетки должны быть продезинфицированы, все соседние животные тщательно осмотрены, и со всеми, у кого есть признаки инфекции, следует обращаться аналогичным образом. Фавус также нападает на кролика, и типичные пятна сначала отмечаются вокруг основания уха.

Заражение *яйцевидным кокцидием* встречается очень часто, однако не проявляет каких-либо симптомов, по которым можно распознать инфекцию. Обычно это состояние отмечается только посмертно, когда обнаруживается, что печень усеяна многочисленными каскадными бугорками, которые при осмотре оказываются кистозными участками, переполненными кокцидиями. Также иногда при вскрытии печени кролика, умершего от какой-либо преднамеренной или случайной бактериальной инфекции, обнаруживается, что она отмечена тонкими желтоватыми прожилками и маленькими бугорками, вызванными зародышами *Tænia serrata*, в то время как кистозная форма (*Cysticercus pisiformis*) часто отмечается свободной в брюшной полости или проникающей в брыжейку.

Образование абсцесса в результате заражения обычными гноеродными бактериями происходит у кролика естественным путем, и часто лабораторное животноводческое помещение опустошается инфекционным сепсисом, вызванным *B. cuniculicida*.

The **Мыши и Крысы** страдают от сепсиса и от формы цистицеркуса *Tænia murina*; кистозная форма (*Cysticercus fasciolaris*) *T. crassicolis* обитает в их печени. Эти мелкие грызуны часто заражаются чесоткой, но при наличии чистой соломы они сами очистятся, протирая ее. Мышь также подвергается атаке фавуса, а крыса часто заражается *Trypanosoma Lewisi*.

The **Морская свинка**, как и кролик, страдает чесоткой и кокцидиозом. Кроме того, он часто естественным образом заражается *B. tuberculosis*, и разумной мерой предосторожности является тестирование животных, как только они попадают в лабораторию, путем инъекции Старого туберкулина Коха—0,5 с.с., вызывающего смерть туберкулезной полости в течение 48 часов.

The **Обезьяна** от природы склонна к туберкулезу, и по прибытии в лабораторию ей следует ввести 1 ст.л. туберкулина старой выдержки. Ткани обезьяны также служат средой обитания для червя-нематоды, паразитирующего у крупного рогатого скота (*ŒSophagostoma inflatum*), напоминающего анкилостому, и этот паразит часто проникает через стенку кишечника и провоцирует образование небольших кист в непосредственно прилегающей брыжейке. Наличие этих кист может вызвать серьезные предположения при вскрытии.

The **Голубь** может быть заражен *гомоспоридиями*, и в его крови обнаруживаются галтеридии. Эта птица также может быть подвержена бактериальной инфекции, известной как дифтерия голубей; в то время как домашняя птица может быть подвержена чесотке и стригущему лишаю или страдать от птичьей холеры или птичьего сепсиса — инфекций, вызванных представителями группы геморрагических септицемий.

Взвешивание.—Крупных животных удобнее всего взвешивать на десятичных весах, снабженных металлической клеткой для их приема вместо обычного лотка (рис. 166). Мышей и крыс взвешивают на модификации весов letter весом до 250 граммов, которые имеют

коническую проволочную клетку (тщательно уравновешенную), заменяющую оригинальную чашу (рис. 167).

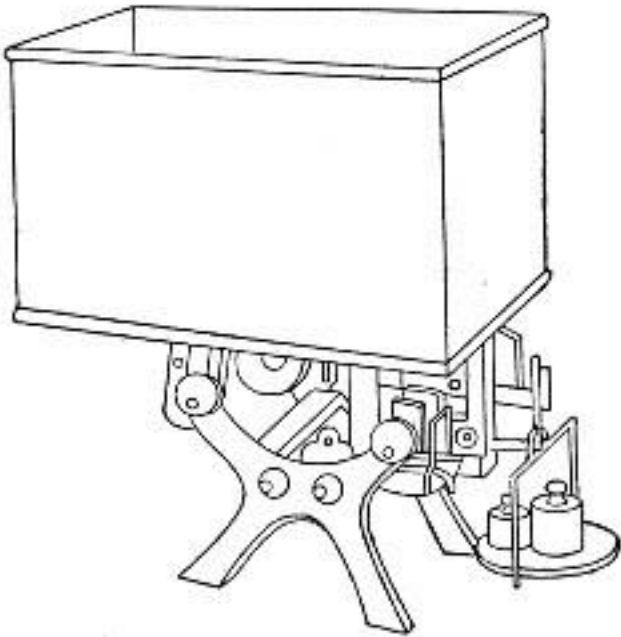


Рис. 166. Чешуя кролика.

Температура.—Чтобы измерить ректальную температуру любого из лабораторных животных, ассистент должен осторожно и крепко удерживать животное. Вставьте колбу обычного клинического термометра, хорошо смазанную вазелином, непосредственно в область анального сфинктера. Оставьте его в таком положении на несколько секунд, а затем мягко и неуклонно надавливайте на него до тех пор, пока вся луковица и часть плодоножки, вплоть до сужения, не войдут в прямую кишку. Через три-пять минут (время, конечно, зависит от чувствительности используемого термометра) извлеките прибор и снимите показания. Термометры, используемые для регистрации температуры, следует время от времени проверять путем сравнения со стандартным термометром, сертифицированным Kew, хранящимся в лаборатории для этой цели.

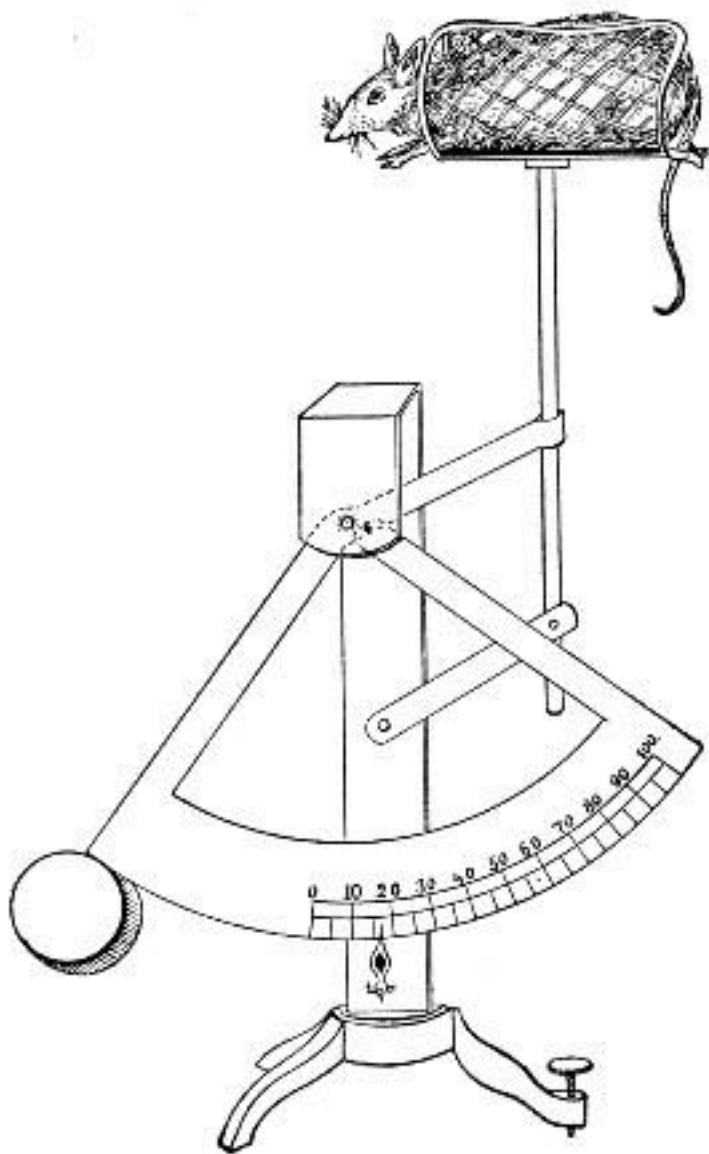


Рис. 167.—Весы мыши

Клетки.—В течение периода, который проходит между прививкой и гибелью или полным выздоровлением, подопытные животные должны содержаться в подходящих емкостях, которые легко содержать в чистоте и легко дезинфицировать.

The *Мышь* обычно хранится в стеклянной банке (рис. 168) высотой 11 см и диаметром 11 см, закрытой проволочной марлевой крышкой, утяжеленной свинцом, или прикрепленной к горловине банки штыковой защелкой. Небольшая продолговатая этикетка размером 5 на 2,5 см, нанесенная пескоструйной обработкой сбоку цилиндра, является очень удобным приспособлением, поскольку пометки, сделанные на ней обычным грифельным карандашом, хорошо видны, и для их удаления требуется только влажная ткань (рис. 168).

The *Крысу* держат под наблюдением в стеклянной банке, аналогичной той, что использовалась для мыши, но большего размера.

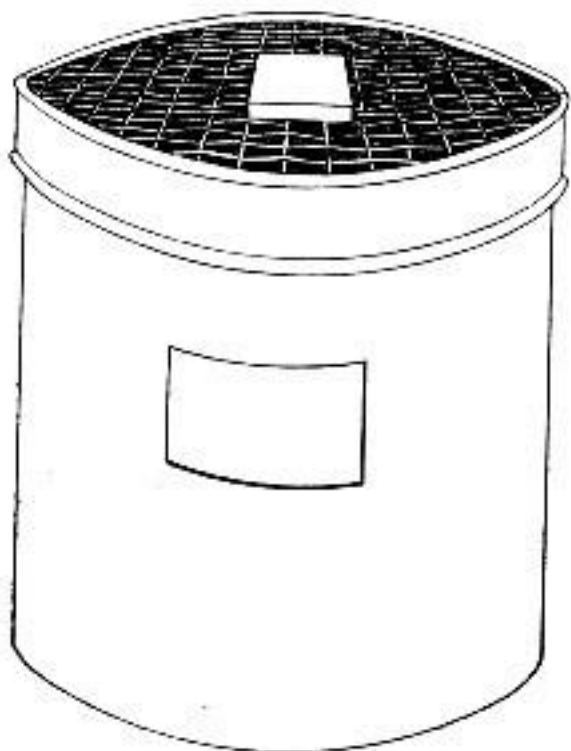


Рис. 168.—Банка для мыши.

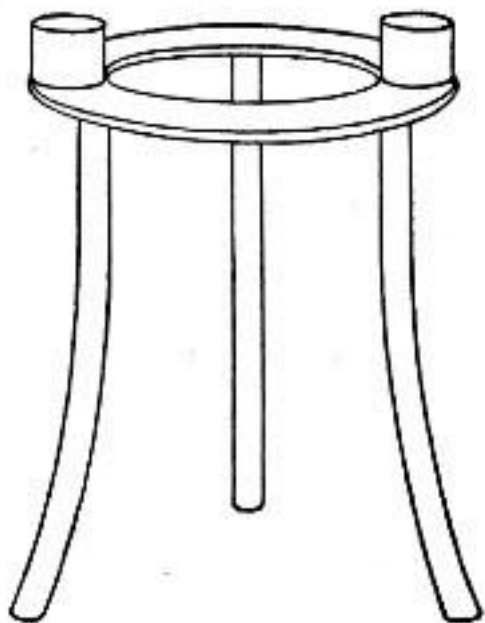


Рис. 169.—Тренога.

Слой опилок на дне банки впитывает любую влагу, а в качестве подстилки следует использовать вату или бумажную стружку. Пища должна состоять из отрубей и овсяных хлопьев с редкими добавками из хлеба и молока.

Использование металлического штатива, на платформе которого припаяны две маленькие чашечки для приема корма, внутри клетки предотвращает растрату корма или его загрязнение экскрементами (рис. 169).

После использования банки и штативы стерилизуют либо химическими реагентами, либо в автоклаве.

The Кролика и морскую свинку содержат в клетках подходящего размера, полностью изготовленных из металла (рис. 170). Стенки, верх и низ сделаны из плетеной проволоки; под клеткой находится подвижный металлический лоток, заполненный опилками, для сбора экскрементов. Клетка в целом приподнимается над землей на коротких ножках. Стенки и т.д., как правило, шарнирно закреплены, так что клетка складывается ровно для удобства хранения, а также стерилизации.

Обычная клетка для крыс, прямоугольный проволочный ящик длиной 30 см спереди назад, шириной 20 см и высотой 14 см, является отличной клеткой для морских свинок, если ее снабдить неглубоким цинковым поддоном 35 на 24 см, на котором она может стоять.

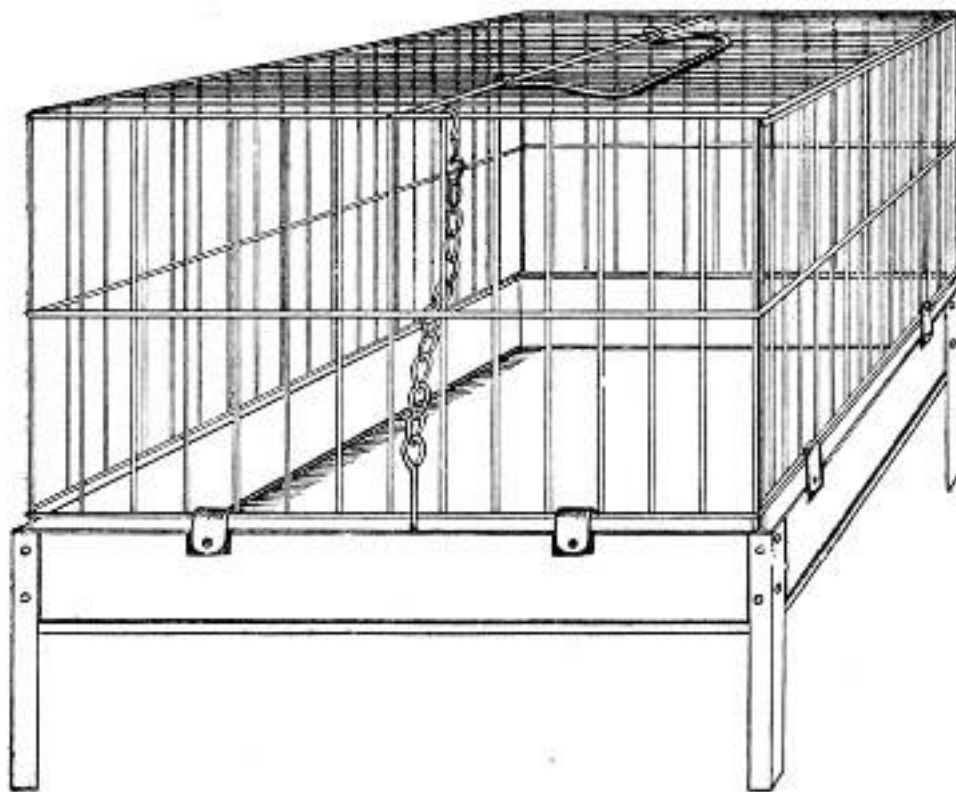


Рис. 170.—Ярость

металлического кролика.

Следует обеспечить обильный запас соломы для подстилки, а пища должна состоять из свежих овощей, листьев капусты, ботвы моркови и репы и т.п. Для утреннего приема пищи и ломаных бисквитов для животных для вечернего приема пищи. Время от времени в клетку можно наливать немного воды в глиняной посуде.

Лоток, на который поступает осадок, следует ежедневно очищать и засыпать свежими опилками, а загрязненные опилки, остатки пищи и т.д. следует кремировать.

Эти клетки стерилизуются после использования либо в автоклаве, либо опрыскиванием формалином.

Поскольку **прививка животных** является чисто хирургической операцией, необходимые инструменты будут аналогичны тем, которые использует хирург, и, как и они, должны быть стерильными. При проведении прививки необходимо уделять строгое внимание асептике и принимать соответствующие меры предосторожности для защиты от случайного загрязнения материала, вводимого животному. Кроме того, руки оператора должны быть тщательно продезинфицированы.

Приведенный ниже список оборудования, используемого при прививках животных, включает практически все необходимое для любой прививки. Излишне отмечать, что все оборудование никогда не потребуется для какой-либо одной прививки.

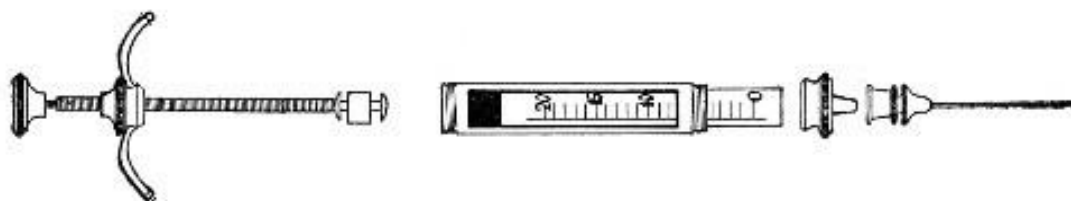


Рис. 171. Шприц

для подкожных инъекций с упорами для пальцев.

Оборудование, необходимое для прививки животных:

1. Стерилизатор для воды (*видео*, стр. 33). Также удобно иметь второй стерилизатор для воды, аналогичный, но меньшего размера (23 на 7 на 5 см), для стерилизации шприцев.
2. Шприц для инъекций. Наилучшей формой является обычная подкожная инъекция емкостью 1 кубический сантиметр с градуировкой в двадцать долей кубического сантиметра (0,05 кубического сантиметра), снабженная упорами для пальцев, но с кожаными шайбами и уплотнением поршня, замененными на асбестовые (рис. 171). Инструмент должен легко разбираться на части, а запасные части следует держать под рукой на случай случайной поломки или потери. Другими полезными шприцами являются шприцы емкостью 2, 5, 10 и 20 куб. см. Необходимо иметь под рукой хороший запас игл, как заостренных, так и с тупыми концами. Чтобы простерилизовать шприц, наполните его водой, ослабьте уплотнение поршня и всех винтовых соединений, поместите его в стерилизатор и кипятите не менее пяти минут. Аналогичным образом продезинфицируйте шприц *после использования*. Иглы, которые чрезвычайно склонны ржаветь после кипячения, следует хранить в емкости с абсолютным спиртом, когда они не используются.
3. Операционный стол.
4. Хирургические инструменты. Стерилизуйте их перед использованием кипячением и дезинфицируйте *после использования* тем же способом. Сразу после завершения дезинфекции вытрите насухо.

Ножницы, щуп с острым концом.

Препарирующие щипцы различных моделей.

Прижимные щипцы.

Ретракторы (маленький самоподдерживающийся рис. 172).

Иглы при аневризме, острые и тупые.

Скальпели, } Кератомы, } с металлическими ручками. Трепанаты, }

Стальные зажимы Michel и специальные щипцы для их наложения. Эти небольшие стальные зажимы позволяют оператору легко и быстро закрывать разрезы на коже и наиболее подходят для операций с животными.

Хирургические иглы.

Иглодержатель.

Мягкие резиновые катетеры различных размеров.

Резиноэластичные бужи для пищевода с подсоединением к соответствующему шприцу.

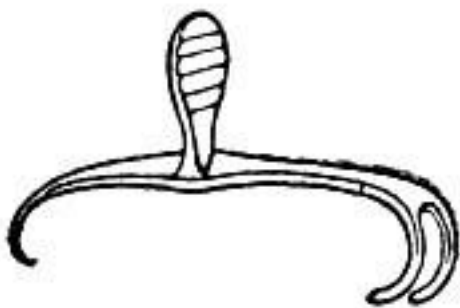


Рис. 172. Небольшие самоподдерживающиеся

втягивающие устройства.

5. Обезболивающее.

(а) Общие сведения: Самым безопасным общим обезболивающим средством для животных является свежеприготовленная смесь АСЕ, содержащая по объему 1 часть спирта, 2 части хлороформа, 6 частей эфира, и ее следует вводить в виде "конуса", образованного путем закручивания одного угла полотенца и помещения внутрь него комочка ваты, или из пропитанного ватным тампоном тампона, помещенного на дно небольшого стакана.

(b) Местный:

1. Гидрохлорид кокаина, 2%. в растворе адреналина в 1 промилле.
2. Бета-эукаин, 2%. в адреналине, 1 промилле раствора.
3. Струйный раствор этилхлорида.

6. Стерильные стеклянные капсулы различных размеров.

7. Коробки со стерильными пипетками { 10 куб.см (в десятых долях кубического сантиметра).
{ 1 у.е. (в сотых долях кубического сантиметра).

8. Колбы (75°С), содержащие стерилизованный физиологический раствор (или стерильный бульон).
 9. Стерилизованная вата. Вату (абсорбент) неплотно упаковывают в медный цилиндр, аналогичный тому, который используется для хранения капсул, и стерилизуют в печи с горячим воздухом.
 10. Стерилизованная марля. Марлю стерилизуют так же, как и вату.
 11. Стерилизованный шелк и кетгут для наложения швов. Их стерилизуют, по мере необходимости, кипячением в течение примерно десяти минут в водяном стерилизаторе.
 12. Гибкий коллодий (или составная настойка бензоина).
 13. Смазать карандаш жиром.
 14. Приклейте целлулоидные этикетки для прикрепления к клеткам.
 15. Бритва.
 16. Маленькая кастрюля с теплой водой.
 17. Жидкое мыло. Жидкое мыло готовят следующим образом: отмерьте 100 граммов мягкого мыла и добавьте к 500 градусам цельсия 2%. раствор лизола в большом стеклянном стакане; растворите, нагревая на водяной бане при температуре около 90 ° С. Разлейте по бутылкам и наклейте "Жидкое мыло".
 18. Вместо жидкого мыла и бритвы иногда удобно использовать порошок для депиляции.
- Сульфид бария 1 часть
Рисовый крахмал 3 части

Густо посыпьте порошком участок, подлежащий удалению волос, сбрызните водой и смешайте в тонкую пасту *in situ*; дайте пасте подействовать в течение трех минут, затем соскребите костяной лопаточкой — волосы удаляются вместе с пастой, оставляя совершенно голый участок. Этот процесс предпочтительно проводить за день до операции.

Материал, используемый для инокуляции.—Инокулируемый материал может быть любым—

1. Культуры бактерий, выращенные в жидкой среде или на твердой среде.
2. Продукты метаболизма бактерий —*например*, токсины в растворе.
3. Патологические продукты (жидкие выделения, твердые ткани).

Приготовление инокулята.—

(а) *Культивирование в жидких средах.*—

1. Подожгите пробку культуральной пробирки.
2. Выньте пробку и подожгите горловину трубки.

3. Слегка приподнимите крышку стерильной капсулы, вставьте горловину культуральной пробирки в отверстие и налейте немного культивируемого материала в капсулу.
4. Извлеките горловину культуральной пробирки из капсулы, установите на место крышку последней, подожгите горловину пробирки и снова вставьте ее в розетку.
5. Извлеките шприц из стерилизатора, выдавите воду из него и дайте остыть.
6. Поднимите крышку капсулы настолько, чтобы в нее вошла игла шприца, и наберите необходимое количество препарата в цилиндр шприца.

(Или извлеките определенное отмеренное количество культивируемого вещества непосредственно из пробирки или колбы с помощью стерильной градуированной пипетки, перелейте отмеренное количество в стерильную капсулу и заполните шприц; или наберите необходимое количество культивируемого вещества непосредственно в градуированный шприц из пробирки или колбы.)

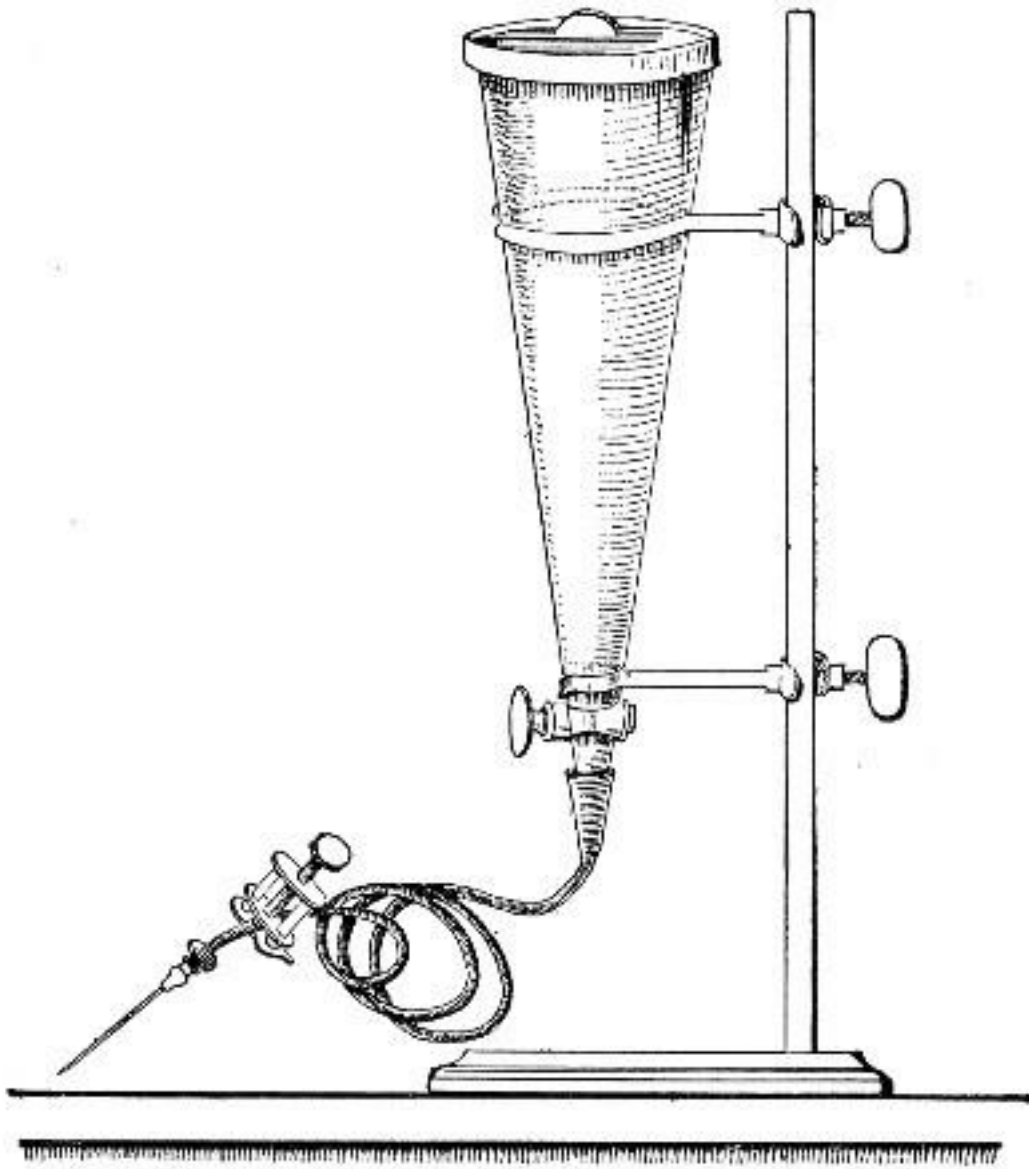


Рис. 173. коническая разделительная воронка, приспособленная для впрыска жидких культур.

Если необходимо ввести животному большой объем жидкости, культивирование следует перенести с соблюдением асептических мер предосторожности в стерильную разделительную воронку, предпочтительно формы, показанной на рисунке 173, и при необходимости с градуировкой. Его устанавливают на подставку для реторты и поднимают достаточно высоко над уровнем животного, которому делают инъекцию, чтобы обеспечить хорошее "падение". Отрезок стерилизованной резиновой трубки подходящей длины, снабженный инъекционной иглой и винтовым зажимом, теперь прикрепляется к соплу воронки, и операция завершается в соответствии с требованиями конкретного случая.

Этот метод вполне удовлетворителен, когда инъекция производится в плевральную или брюшную полости или непосредственно в вену, но если инъекцию приходится делать в подкожную клетчатку, "падения" может быть недостаточно для вытеснения жидкости. В этом случае необходимо будет перенести культуру в стерильный флакон для промывания и прикрепить резиновый ручной сильфон к трубке для впуска воздуха (вставив воздушный

фильтр), а трубку с инъекционной иглой присоединить к выпускной трубке (рис. 174). При осторожном использовании можно добиться достаточного усилия для осуществления впрыска.

(b) *Культивирование на твердых средах (например, на наклонном агаре).*—

1. С помощью стерильной градуированной пипетки введите подходящее небольшое количество стерильного бульона (или стерильного физиологического раствора) в пробирку для культивирования.

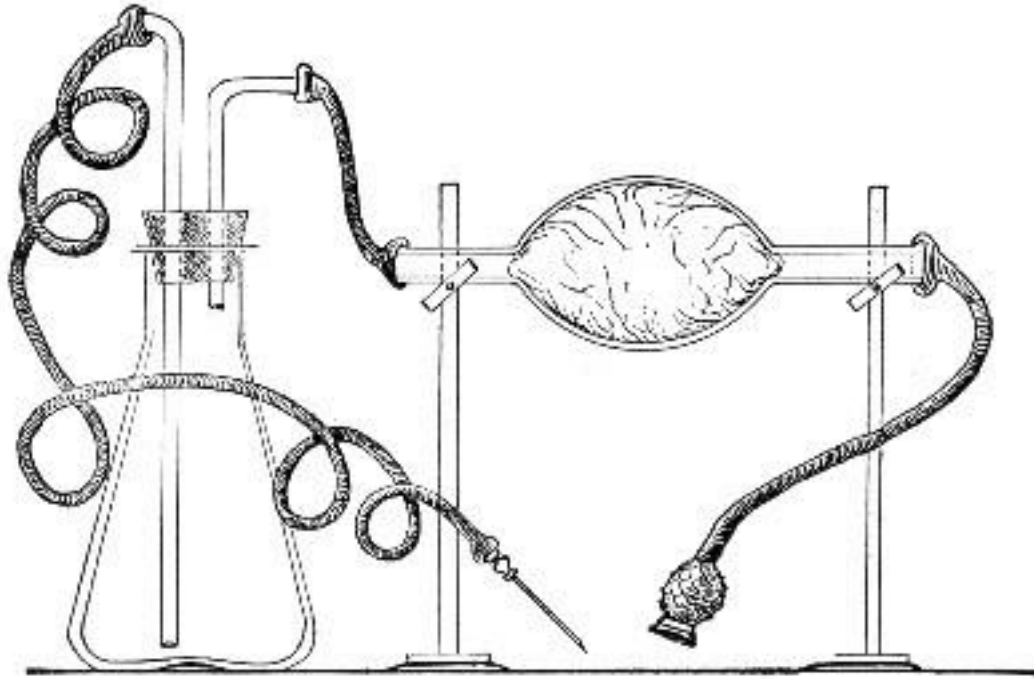


Рис. 174. Устройство

для нагнетания давления.

2. Стерильной платиновой петлей или лопаточкой соскребите бактерии с поверхности среды и эмульгируйте их с бульоном. Затем он становится по сути жидким инокулятом.

3. Перелейте эмульсию в стерильную капсулу и наполните из нее шприц.

(c) *токсины.*—Приготовлены ранее описанными методами (*видео*, стр. 318), обрабатываются аналогично культивированию в жидких средах.

(d) *Патологические продукты.* Жидкие выделения, экскременты и т.д., такие как серозный экссудат, гной, кровь и т.д., рассматриваются как жидкие культуры; но если материал очень густой или вязкий, для его разбавления можно использовать небольшое количество стерильного бульона или обычного физиологического раствора, и тщательное введение осуществляется с помощью стерильной платиновой палочки.

Твердые ткани, такие как селезенка, лимфатические узлы и т.д., можно разделить на мелкие кусочки стерильными инструментами и растереть в стерилизованной агатовой ступке (используя агатовый пестик) с небольшим количеством стерильного бульона, а полученной эмульсией наполнить шприц.

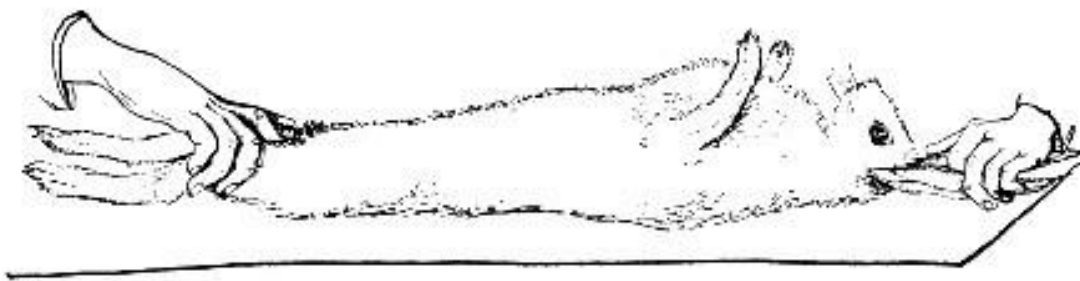


Рис. 175.—

Держащий кролика для бритья.

Если требуется привить ткань *в массовом порядке*, извлеките из материала небольшой кубик толщиной 1-2 мм и введите его в рану, образованную стерильными инструментами в подходящем месте, и закройте рану с помощью стальных зажимов Michel's и герметичной повязки.

Способ закрепления животных во время прививки.—

Для большинства прививок, особенно когда обезболивающее не вводится, обычно нанимают помощника для удержания животного (см. рис. 175).

При работе одной рукой держатель Voge для морских свинок является полезным приспособлением, способ использования которого хорошо виден на прилагаемых рисунках (рис. 176, 177).

Сам инструмент состоит из полого медного цилиндра, один конец которого натянут на кольцо из толстой медной проволоки, и на этом открытом конце вырезана прорезь, проходящая примерно наполовину вдоль одной стороны цилиндра. Противоположный конец закрыт "съемным" колпачком и перфорирован по краю рядом вентиляционных отверстий, которые соответствуют отверстиям, вырезанным в ободке колпачка. В случае, если животное сопротивляется попыткам снять его с держателя задом наперед, этот колпачок снимается, держатель ставится на стол, и морской свинке разрешается выйти.

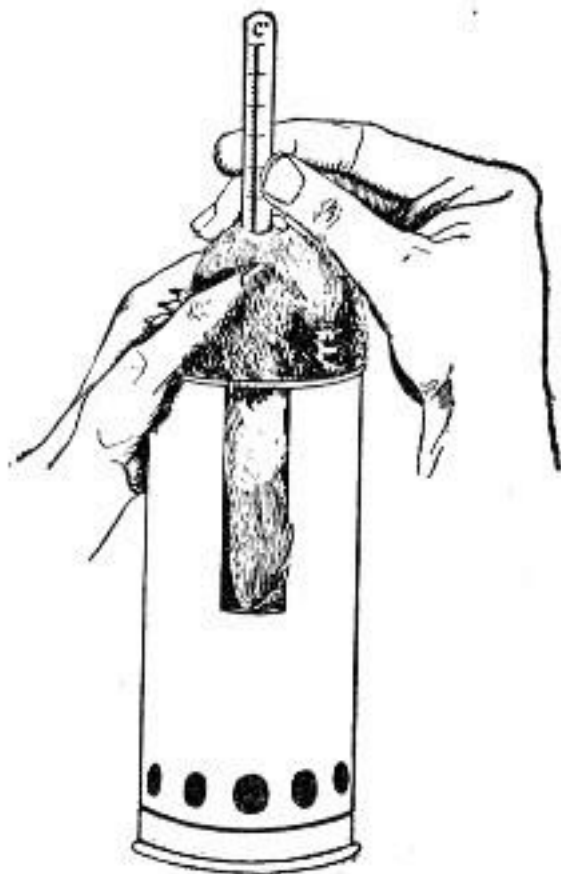


Рис. 176.Измерение температуры морской свинки.

Для содержания животных разного размера пригодятся два размера этого держателя:

1. Длина 16 см.; ширина 6 см.; размер прорези 8 см. на 2,5 см.
2. Длина 20 см.; ширина 8 см.; размер прорези 10 см. на 2,5 см.

На рисунке 178 показан удобный держатель для мышей и даже маленьких крыс, хвост которых надежно удерживается пружинящим зажимом. Излишне говорить, что держатель должен быть полностью металлическим, а проволоочный каркас съёмным и легко заменяемым.

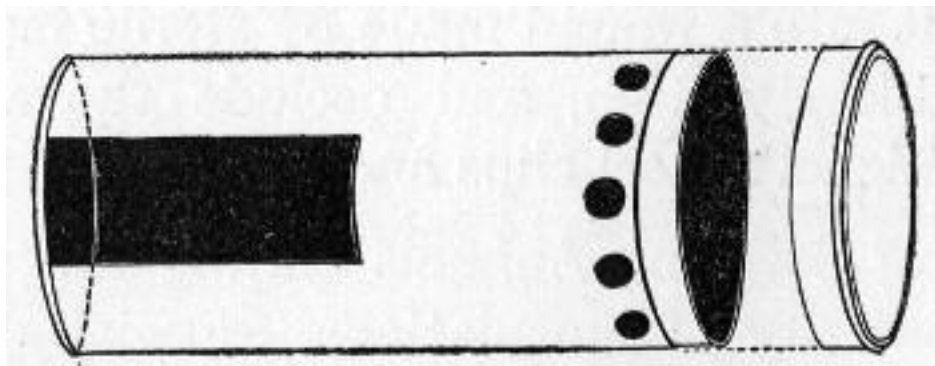


Рис. 177.Держатель Вожжа.

Когда животное обезболивается, удобнее надежно прикрепить его к какому-нибудь простому операционному столу, такому как стол Татена (рис. 179), на котором поместятся кролики, морские свинки и крысы: или к более сложному столу, разработанному автором (рис. 180).

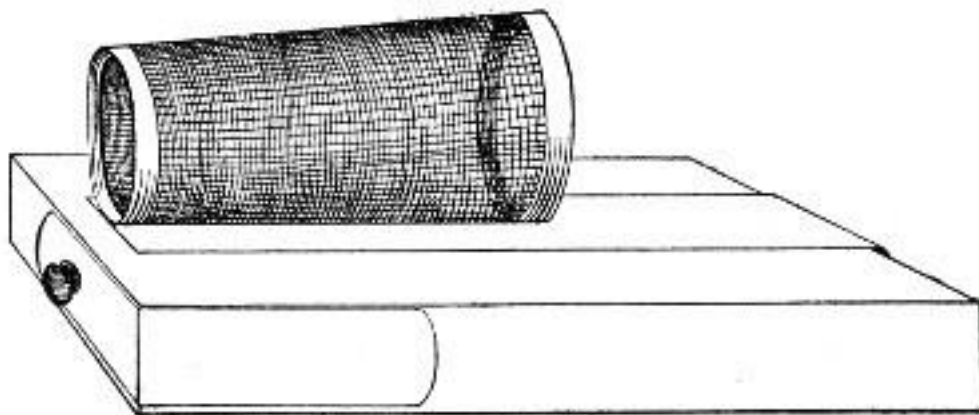


Рис. 178.—Держатель

для мыши.

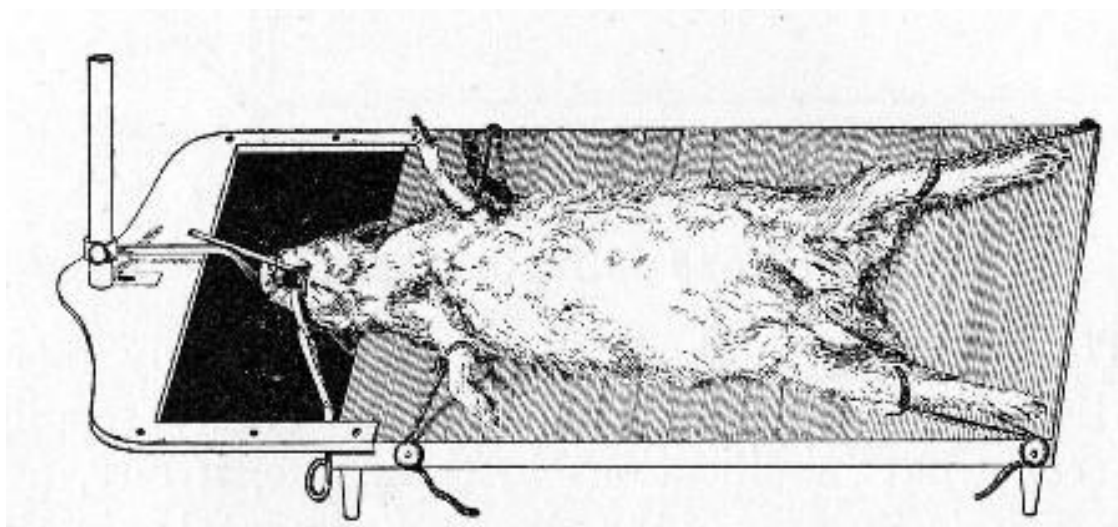


Рис. 179.

Операционный стол Татен.

Операционный стол.—Это стол "асептического" типа, состоящий из стальных трубок, покрытых никелем или эмалью. Рама столешницы достаточно велика, чтобы вместить кроликов, собак и обезьян; она опирается на телескопические стойки, так что ее можно регулировать по высоте; по своей длинной оси она может быть наклонена (с любого конца) на 45° от горизонтали. Кроме того, его можно полностью поворачивать вокруг своей длинной оси. Сама столешница состоит из листа сетки из медной проволоки, свободно подвешенного к длинным сторонам трубчатого каркаса. Незакрепленность марлевого слоя позволяет подложить под животное резиновую грелку или электротермометр, и если в ходе эксперимента необходимо перевернуть животное, полностью поворачивают раму столешницы, отсоединяют приспособление для подвешивания марли и переворачивают марлю, чтобы она снова поддерживала животное снизу.

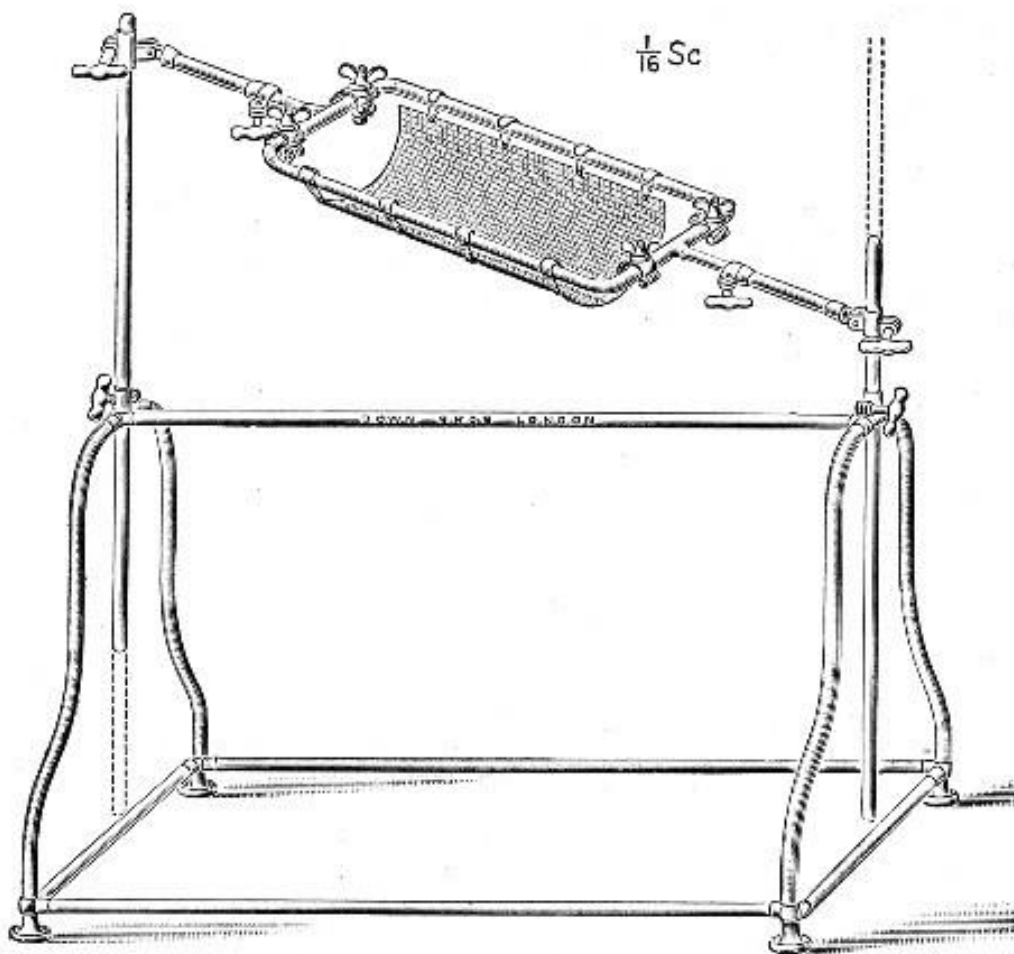


Рис. 180.—

Авторский операционный стол[12]

МЕТОДЫ ПРИВИВКИ.

Следующие методы прививки более конкретно применимы к кролику, но из них легко будет увидеть, какие модификации в технике, если таковые имеются, необходимы в случае с другими экспериментальными животными.

1. Кожная прививка. (Обезболивающего нет.)

1. Ассистент должен крепко удерживать животное (или прикрепить его к операционному столу).
2. Нанесите жидкое мыло на шерсть, на область, выбранную для прививки, с помощью ватного тампона и обильно вспеньте теплой водой; тщательно побейтесь; или нанесите порошок для депиляции.
3. Тщательно промойте оголенный участок кожи 2-процентным раствором. лизола.
4. Смойте лизол эфиром и дайте последнему испариться.
5. Сделайте множество коротких, параллельных, поверхностных надрезов острием стерильного скальпеля.
6. Когда кровотечение из разрезов прекратится, вотрите инокулят в места скарификации плоской стороной лезвия скальпеля или стерильным платиновым шпателем.

7. Накройте привитый участок подушечкой из стерильной марли, закрепленной *in situ* полосками лейкопластыря или заклеив края марли коллодием.

8. Освободите животное, поместите его в клетку и прикрепите этикетку, на которой написано:

- (a) отличительное название или номер животного.
- (b) Его вес.
- (c) Сведения об источнике и дозе инокулята.
- (d) Дата прививки.

2. Подкожная инокуляция.—

(a) *Жидкий инокулят.*—(Обезболивающее отсутствует.)

Шаги 1-4. Что касается кожной прививки.

5. Зажмите кожную складку между указательным и большим пальцами левой руки; возьмите заряженный шприц для подкожных инъекций в правую руку, введите иглу в приподнятый участок кожи большим и указательным пальцами левой руки и неуклонно продвигайте ее вперед, пока примерно 2 см иглы не окажутся в подкожной клетчатке. Теперь отпустите захват левой руки и медленно введите жидкость, содержащуюся в шприце.

6. Извлеките иглу и в тот же момент закройте место прокола комочком ваты, чтобы предотвратить утечку какой-либо части инокулята. Введенная жидкость, если только ее количество не велико, всасывается в течение очень короткого времени.

7. Этикетка и т.д.

(b) *Твердый инокулят.* — (Без анестетика; или аэрозоль этилхлорида.)

Шаги 1-4. Что касается кожной прививки.

5. Приподнимите небольшую складку кожи пинцетом и сделайте небольшой надрез на коже остроконечными ножницами или кончиком скальпеля.

6. Вставьте зонд через отверстие и неуклонно продвигайте его вперед в подкожной клетчатке, а затем боковыми движениями отделите кожу от подлежащих мышц, чтобы сформировать воронкообразный карман вершиной к месту входа.

7. С помощью пары тонкоострых щипцов введите небольшой кусочек инокулята в этот карман и поместите его как можно дальше от места входа.



Рис. 181. Шприц—

стеклянная трубка для подкожной "твердой" инокуляции.

Или сделайте импровизированный шприц, вставив кусок стеклянной палочки (которая будет служить поршнем) в отверстие стеклянной трубки немного меньшей длины и зафиксировав ее с помощью резиновой трубки. Стерилизуйте кипячением. Отодвиньте стержень на несколько

миллиметров и поместите кусочек ткани внутрь отверстия трубки с помощью стерильных щипцов. Теперь вставьте трубку в глубину "кармана", надавите на стеклянный стержень так, чтобы он выступал за пределы конца трубки, и извлеките устройство, оставив ткань в ране.

8. Закройте рану на коже зажимами Мишеля и повязкой из марли, пропитанной коллодием (или цинком. бензоин).

9. Этикетка и т.д.

3. Внутримышечно.—

(a) *Жидкий инокулят.—(Обезболивающий, отсутствует.)*

Шаги 1-4. Что касается кожной прививки.

5. Слегка раздвинув указательный и большой пальцы левой руки, надавите на кожу над выбранной мышцей или мышцами.

6. Смело вводите иглу инъекционного шприца в мышечную ткань и медленно вводите инокулят.

7. Этикетка и т.д.

(b) *Твердый инокулят.—(анестезия, А. С. Е.)*

1. Прикрепите животное к операционному столу и сделайте анестезию.

2. Побрейте и продезинфицируйте кожу в месте операции.

3. Оберните область операции полосками марли, отжатой в 2-процентном растворе. раствор лизола.

4. Поочередно надрежьте кожу, апоневроз и мышцу.

5. Нанесите инокулят в глубину разреза.

6. Закройте рану в мышце заглубленными швами, а кожную рану непрерывными или прерывистыми швами или стальными зажимами Michel's.

7. Наложите герметичную повязку из марли и коллодия.

8. Снимите животное с операционного стола.

9. Этикетка и т.д.

4. Внутривентриально.—

(a) *Жидкий инокулят.—(Обезболивающий, отсутствует.)*

Шаги 1-4. Что касается прививки кожи. Побрейте довольно широкую поперечную область, простирающуюся от бока до бока.

5. Приложите указательный палец левой руки к одному боку, а большой - к противоположному и сведите треугольным сгибом всю толщину теменной части живота. Теперь, наложив брюшные

поверхности (которые находятся в соприкосновении) одна на другую, убедитесь, что в складку не входят витки кишечника.

6. Возьмите шприц в правую руку и проколите иглой складку у ее основания (рис. 182).

7. Теперь отпустите складку, но держите шприц ровно; по мере того, как париеты расправляются, кончик иглы остается свободным в брюшной полости (см. рис. 183).

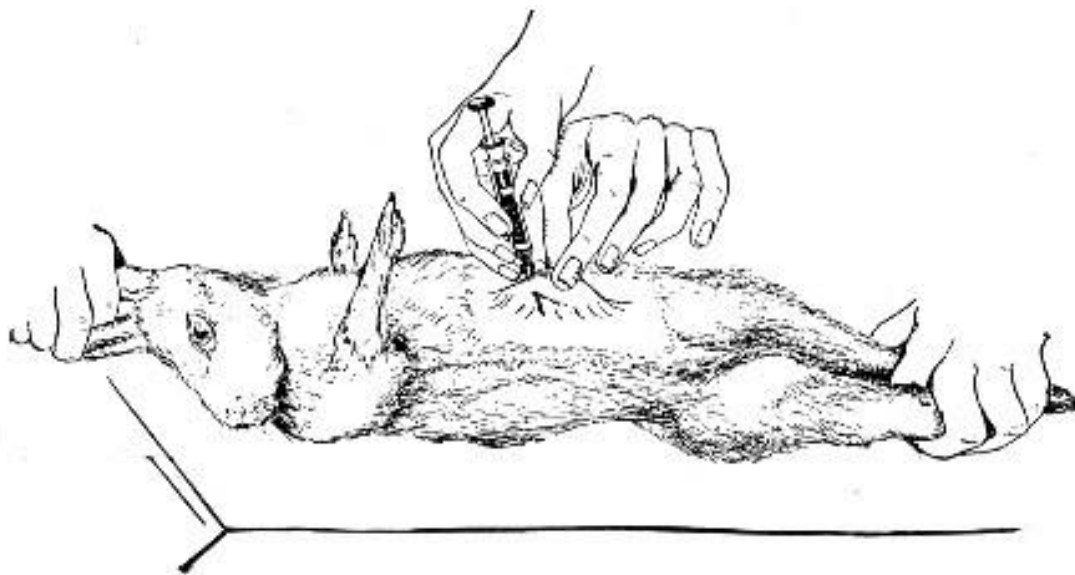


Рис.

182. Внутривентрикулярная посевная жидкость.

8. Введите жидкость из шприца.

9. Этикетка и т.д.



Рис. 183. Разрез брюшной стенки и т.д., показывающий острие иглы, свободно лежащее в брюшной полости над извилинами кишечника.

Второй способ:

Шаги 1-4. Как и в первом способе.

5. Обезболивайте небольшой выбранный участок кожи, опрыскивая его хлористым этилом.

6. Нагрейте платиновую обжигающую проволоку (0,5 мм. проволоку, скрученную по форме, указанной на рисунке 184, закрепленную в алюминиевой ручке) до покраснения и с ее помощью прожигают отверстие в анестезируемом участке кожи и брюшных мышцах вплоть до висцеральной брюшины, но не через нее.

7. Прикрепите иглу с тупым концом к заряженному шприцу и, плотно прижимая закругленный конец к брюшине, легко протолкните ее в брюшную полость.

8. Введите жидкость из шприца.

9. Этикетка и т.д.

Этот метод особенно полезен, когда требуется время от времени забирать образцы перитонеальной жидкости в течение периода наблюдения, поскольку жидкость можно периодически удалять из брюшной полости через это отверстие в стенках брюшной полости с помощью стерильной капиллярной пипетки.

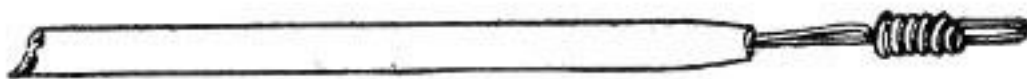


Рис. 184.Платиновая

проволока для прожигания отверстий в темени.

(b) *Твердый инокулят* (или имплантация капсул, содержащих жидкие культуры).—(Анестезия, А.С. Е.)

1. Дайте животному наркоз и закрепите его на операционном столе.

2. Побрейте большую область теменной части живота.

3. Сделайте надрез на коже по средней линии длиной около 2 см., на полпути между нижним концом грудины и лобком.

4. Разделите апоневрозы между прямыми мышцами по указателю.

5. Разделите брюшину по назначению.

6. Введите инокулят в брюшную полость.

7. Закройте брюшную полость швами Лембера.

8. Закройте разрезы кожи и апоневроза узловыми швами или стальными зажимами Мишеля и наложите герметичную повязку.

9. Снимите животное с операционного стола.

10. Этикетка и т.д.

Подходящие мешочки можно легко приготовить любым из следующих методов:

А. Коллодиевые мешочки.

1. Опустите небольшую пробирку (5 на 0,5 см) доньшком вниз в мензурку с коллодием и высушите на воздухе; повторите этот процесс три или четыре раза.

2. Опустите пробирку, покрытую коллодием, попеременно в мензурку со спиртом и в мензурку с водой. Это разрыхляет коллодий и позволяет отделить его в форме небольшой пробирки.

3. Возьмите стеклянную трубку длиной 20 см, примерно такого же диаметра, как пробирка, используемая для формирования мешка, и вставьте один конец в открытое горлышко мешка.

4. Подвесьте стеклянную пробирку с прикрепленным к ней мешочком внутри пробирки большего размера, набив горлышко пробирки ватой вокруг стеклянной трубки, и поместите в инкубатор при температуре 37 ° С на двадцать четыре часа. При извлечении из инкубатора мешочек будет прочно прикреплен к концу стеклянной трубки.

5. Заткните открытый конец стеклянной трубки ватой и простерилизуйте пробирку и ее содержимое в печи с горячим воздухом.

Чтобы использовать мешочек, снимите пробку со стеклянной трубки, частично заполните мешочек культурой, подлежащей инокуляции, с помощью стерильной капиллярной пипетки и установите трубку на место. После вскрытия брюшной полости извлеките трубку и прикрепленный к ней мешочек из защитной пробирки, закройте мешочек, плотно обвязав его стерилизованной шелковой нитью немного ниже конца стеклянной трубки, и отделите его от трубки, разрезав коллодий над лигатурой, и мешочек будет готов для введения в брюшную полость.

Б. Целлоидиновые мешочки (Харрис).

Требуются материалы.

Стеклянная трубка с пером.

Желатиновые капсулы, которые фармацевты готовят для выставки объемных порошков.

Различные сорта целлоидина, густого и разбавленного, во флаконах с широким горлышком.

1. Возьмите кусочек трубки из гусяного стекла длиной около 4 см и диаметром 5 мм; нагрейте один конец в пламени бунзена.

2. Проденьте нагретый конец тюбика через один конец желатиновой капсулы и дайте ей остыть (рис. 185).

3. Удалите остатки желатина из просвета тюбика нагретой платиновой иглой; смажьте место соединения капсулы и тюбика целлоидином средней толщины и дайте высохнуть.



Рис. 185. Изготовление целлоидиновых капсул.

4. Опустите капсулу в мензурку, содержащую тонкий слой целлоидина, за пределы соприкосновения со стеклом и после извлечения поверните ее перед выдувной трубкой, чтобы равномерно высушить. Повторяйте эти действия до получения достаточно толстого покрытия.
5. Нанесите густой целлоидин на место соединения трубки и капсулы, противоположный конец капсулы и линию соединения капсулы с ее крышкой; тщательно высушите.
6. С помощью пипетки наполните капсулу (через прилагаемую трубку) горячей водой и подержите капсулу в стакане с кипящей водой несколько минут, чтобы желатин расплавился.
7. Удалите раствор желатина с внутренней стороны целлоидиновой упаковки с помощью пипетки.
8. Наполните мешочек питательным бульоном и поместите его *стеклянной пробиркой вниз* в пробирку, содержащую достаточное количество стерильного питательного бульона, чтобы

покрыть мешочек на глубину 1 см. Закупорьте пробирку и стерилизуйте в пароварке обычным способом.

9. Чтобы подготовить мешочек к использованию, вылейте его из пробирки для бульона в стерильную стеклянную посуду.

10. Захватите губками стерильных щипцов пробирку у места ее соединения с мешочком и с помощью пипетки-соска удалите достаточное количество содержащегося бульона, чтобы в мешочке осталось небольшое пространство. Введите инокулят в виде эмульсии с помощью другой пипетки.

11. Все еще удерживая трубку щипцами, извлеките ее и запечатайте рядом с мешочком в пламени паяльной трубки.

12. Когда пакет остынет, промойте его в стерильной воде, затем переложите в пробирку с питательным бульоном и инкубируйте в течение ночи, чтобы определить его непроницаемость для бактерий.

13. Если бульон вне мешочка остается стерильным, вставьте мешочек в брюшную полость экспериментального животного.

5. Внутрочерепной.—(Анестезия, А. С. Е.)



Рис. 186. Защищенный трепан.

Трепаны и хирургический механизм.—Наиболее полезным инструментом для внутрочерепных операций на животных является маленький назальный трепанатор (Curtis), имеющий режущий круг зуба 7 мм. Дополнительный регулируемый защитный воротник, закрепленный винтом, предотвращает случайный разрыв твердой мозговой оболочки или вещества головного мозга[13] (рис. 186). Этот размер подходит для обезьян, собак, кошек и крупных кроликов. Из других, меньших размеров, которые пригодятся для морских свинок и других мелких животных, вырежьте круги диаметром 6 и 4 мм.; для очень мелких животных — молодых морских свинок и крыс - маленькой зубной дрелью или шурупом сделайте достаточно большое отверстие, чтобы в него вошла игла шприца. Трепанатор можно вставить в обычные металлические ручки и вращать вручную, но какой-либо хирургический механизм гораздо предпочтительнее с точки зрения скорости и безопасности для животного. Электрический стоматологический движок парня[14] (рис. 187), который может подключаться к розетке лампы или настенной розетке и управляется ножным выключателем, хотя и недорогой, в высшей степени удовлетворителен.

Примечание.—Тонкая стоматологическая бормашина, прикрепленная к зубному двигателю, упрощает изготовление игл для алюминиевых ручек (см. стр. 71).

(а) Субдуральный.

1. Сделайте животному анестезию и прикрепите его к операционному столу спинкой вверх.

2. Сбрейте участок кожи головы непосредственно перед ушами.

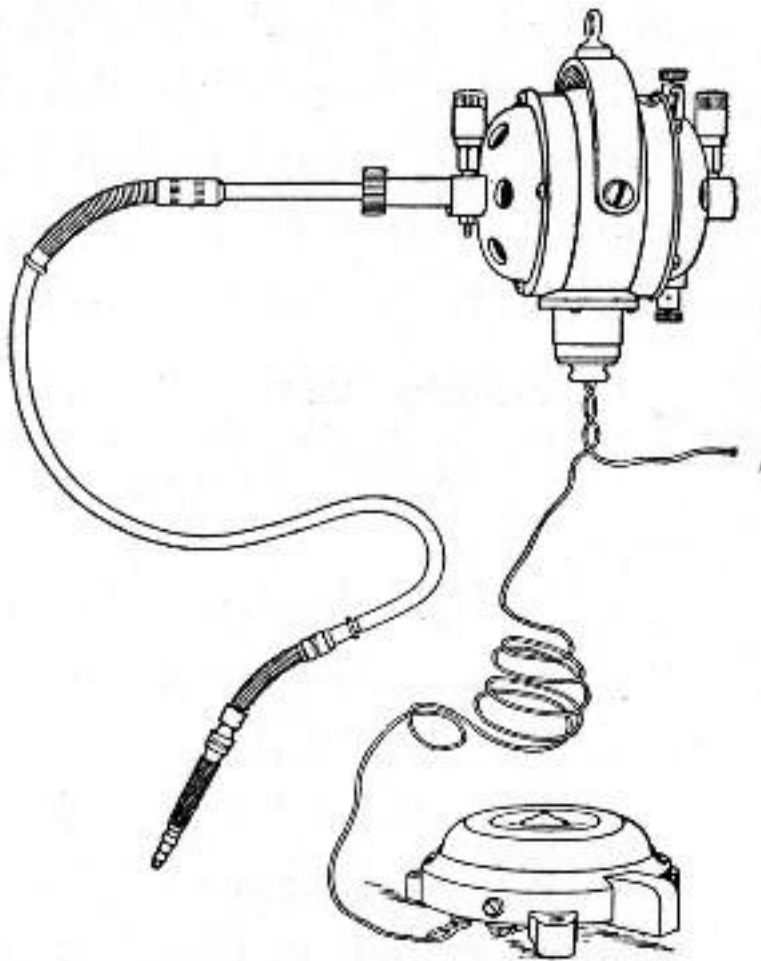


Рис. 187. Электрический

стоматологический двигатель Гая.

3. Выделите острым скальпелем серповидный лоскут кожной мышцы и т.д., выпуклостью вперед, начинающийся на 0,5 см перед корнем одного уха и заканчивающийся в аналогичном месте перед другим ухом. Отрастите отмеченный клапан.

4. Сделайте соответствующий разрез через надкостницу и приподнимите ее тупым диссектором.

5. С помощью небольшого трепанга (диаметром 6 мм) удалите круглый кусочек кости из теменного сегмента. Центр отверстия для трепанации должен находиться на пересечении срединной линии и линии, соединяющей задние канти (рис. 188).

6. Введите инокулят с помощью шприца для подкожных инъекций, прокалывая твердую мозговую оболочку иглой и размещая материал непосредственно под этой оболочкой, в то же время соблюдая осторожность, чтобы не травмировать придаточные пазухи.

7. Отверните лоскут кожи и закрепите его на нужном месте стальными зажимами Michel.

8. Оберните стерильной марлей и ватой и запечатайте повязку с помощью коллодия.

9. Этикетка и т.д.

(b) *Внутримозговой.*—Эта инокуляция выполняется точно так же, как и при субдуральном введении, за исключением этапа 6. Игла после перфорации твердой мозговой оболочки продвигается вперед в вещество одного или других полушарий головного мозга, прежде чем содержимое будет выброшено.

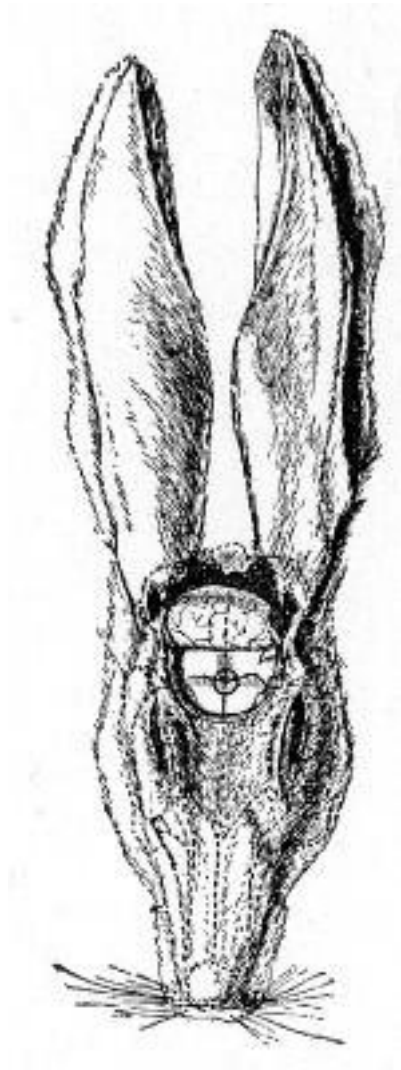


Рис. 188. Внутричерепная прививка кролику. Кругком обозначено положение трепанационного отверстия.

6. Внутриглазный.—

(a) *Жидкий инокулят.*—(Анестетик, кокаин.)

1. Закапайте несколько капель стерильного раствора кокаина и повторите закапывание через две минуты.
2. Через пять минут ассистент должен крепко удерживать животное, как при внутривенной инъекции (см. рис. 189), при этом голова должна поддерживаться руками ассистента.
3. Выберите две иглы, чтобы они точно подходили к одному и тому же шприцу, и простерилизуйте.
4. Присоедините одну иглу к шприцу, наберите необходимую дозу инокулята и извлеките иглу.

5. Зафиксируйте глаз фиксирующими щипцами; затем проткните роговицу другой иглой шприца и дайте жидкости выйти через иглу.

6. Не вынимая иглу из роговицы, присоедините шприц и сделайте инъекцию в переднюю камеру.

7. Промойте конъюнктивальный мешок стерильным физиологическим раствором.

8. Этикетка и т.д.

(b) Твердый инокулят.—(Анестезия, А. С. Е.)

1. Сделайте животному анестезию и надежно прикрепите его к операционному столу.

2. Тщательно промойте конъюнктивальный мешок стерильным физиологическим раствором.

3. Сделайте разрез через верхний квадрант роговицы в переднюю камеру с помощью треугольного кератома.

4. Отделите края раны роговицы гибким серебряным шпателем; захватите твердый инокулят щипцами для ирисовой оболочки, введите его через рану роговицы и нанесите на переднюю поверхность радужки; извлеките щипцы.

5. Снова промойте мешочек и поверхность роговицы.

6. Снимите животное с операционного стола.

7. Этикетка и т.д.

7. Внутривенный.—

Жидкий инокулят.—(Анестетика отсутствует.)

1. Попросите помощника крепко держать животное. (В этом случае передняя нога выбранной стороны подтягивается ассистентом и удерживается ухом этой стороны.)

2. Тщательно побрейтесь по подмышечной линии и продезинфицируйте оголенную кожу.

3. Смело введите иглу шприца через пятое или шестое межреберье в легочную ткань.

4. Медленно вводите содержимое шприца.

5. Этикетка и т.д.

8. Внутривенно.—

Жидкий инокулят.—(Анестетика отсутствует.)

Местом, выбранным для инъекции кролику, является задняя ушная вена (см. рис. 192). Хотя она меньше срединной вены, она прочно связана с хрящом уха плотной соединительной тканью и поэтому более легкодоступна. (У морской свинки должна быть использована яремная вена, и для удовлетворительного выполнения прививки животному должно быть введено общее обезболивающее. У обезьяны или собаки внутренняя подкожная вена является наиболее

удобной, и перед пункцией ее следует растянуть или сделать выступающей путем сжатия вены над выбранным участком.)

Подготовка инокулята.—При подготовке инокулята необходимо соблюдать осторожность, поскольку введение даже небольших фрагментов может вызвать смертельную эмболию. Чтобы избежать этого риска, жидкость следует, по возможности, отфильтровать через стерильную фильтровальную бумагу перед наполнением шприца.

Пузырьки воздуха при введении в вену часто приводят к немедленной смерти. Чтобы предотвратить это, шприц после наполнения следует держать в вертикальном положении, иглой вверх. Затем на иглу надевается кусочек стерильной фильтровальной бумаги, и поршень шприца нажимается вверх до тех пор, пока из цилиндра и иглы не выйдет весь воздух. Если какие-либо капли инокулята будут выдавлены, они попадут на фильтровальную бумагу, которую следует немедленно сжечь.

1. Ассистент должен крепко удерживать животное. Выбранное ухо берется за его основание и вытягивается вперед по направлению к оператору.
2. Побрейте заднюю границу тыльной поверхности уха.
3. Продезинфицируйте кожу над веной, энергично растирая ее ваткой, смоченной лизолом. Трение сделает вену более заметной. Смойте лизол эфиром и дайте последнему испариться.
4. Прикажите ассистенту сжать вену у основания уха. Это приведет к набуханию ее периферической части и увеличению в размерах.
5. Держите шприц как авторучку и вводите острие иглы через кожу и стенку вены до тех пор, пока оно не войдет в просвет вены (рис. 189). Теперь надавливайте на нее по направлению кровотока —*то есть* по направлению к телу животного.
6. Прикажите ассистенту прекратить сдавливание корня уха и *медленно* ввести инокулят. (Если жидкость нагнетается в подкожную клетчатку, на что сразу указывает возникающий отек, инъекцию следует прекратить и предпринять еще одну попытку в месте ближе к корню уха или в какой-либо точке соответствующей вены на противоположном ухе.)
7. Извлеките иглу и прижмите кусочек ваты к месту прокола, чтобы убедиться в закрытии отверстия в стенке вены.
8. Этикетка и т.д.

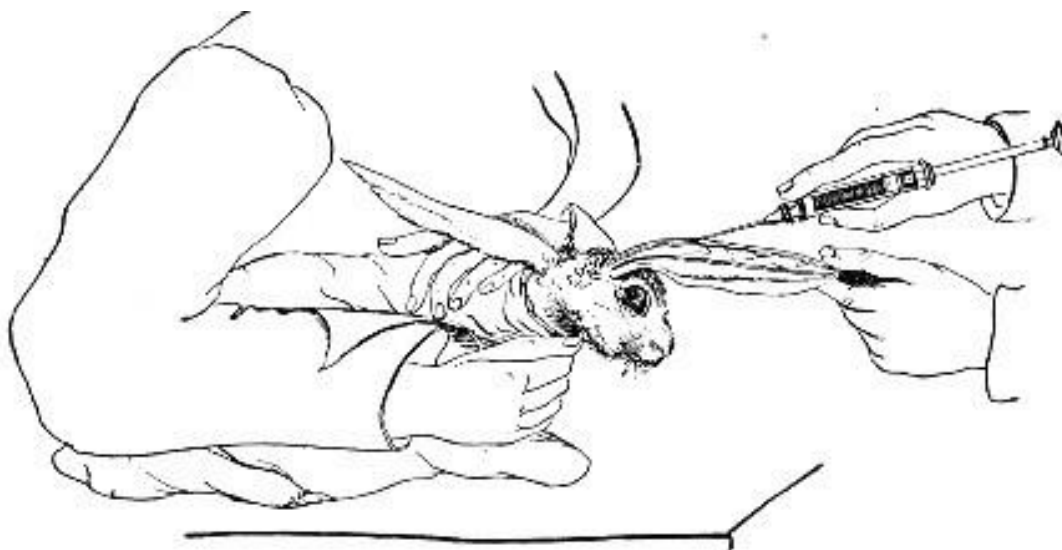


Рис.

189. Внутривенная прививка.

9. Вдох.—

(а) Жидкий инокулят.—(Обезболивающего нет.)

1. Поместите животное в закрытую металлическую коробку.
2. Через отверстие с одной стороны введите сопло какого-нибудь простого распылителя, например, такого, который используется для назальных лекарств.
3. Заполните резервуар инструмента (предварительно простерилизованного) жидким инокулятом и, установив сильфон, распылите инокулят во внутреннюю часть коробки.
4. По завершении опрыскивания откройте коробку и тщательно опрыскайте животное 10-процентным раствором. раствора формальдегида (для уничтожения любого вируса, который может прилипнуть к меху или перьям).
5. Перенесите животное в клетку.
6. Этикетка и т.д.
7. Тщательно продезинфицируйте ингаляционную камеру.

(b) Жидкий или порошкообразный инокулят.—Анестетик, А. С. Е.

1. Сделайте животному анестезию и надежно прикрепите его к операционному столу.

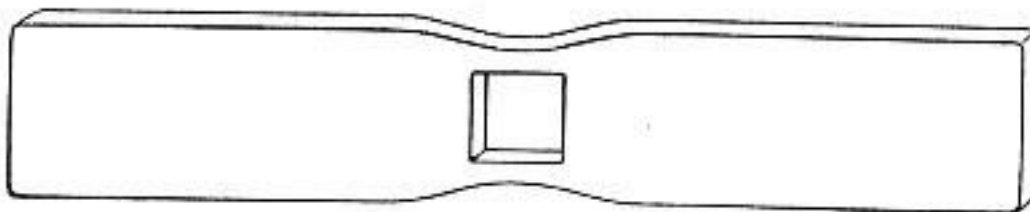


Рис. 190. Кляп для

кроликов.

2. Откройте рот с помощью какого-либо вида кляпа; захватите язык щипцами и вытяните его вперед.

Наиболее удобной формой кляпа для кролика или кошки является та, что показана на рис. 190. Это просто полоска твердого дерева, имеющая форму посередине и снабженная квадратным отверстием, через которое можно провести трахеальную или пищеводную трубку.

3. Пропустите предварительно стерилизованную стеклянную трубку (длиной 17 см, диаметром 0,5 см, со слегка изогнутым концом 2 см) через гортань в трахею.

4. Подсоедините прямую часть трубки Y-образной формы к верхнему концу стерилизованной пробирки и соедините одну ветвь Y с разделительной воронкой, содержащей жидкий инокулят, или инсуффлятором, содержащим порошкообразный инокулят, а другую - с ручным сильфоном.

5. Дайте жидкому инокуляту проникнуть в легкие под действием силы тяжести или вдуйте порошкообразный инокулят с помощью резинового меха.

6. Извлеките интратрахеальную трубку; отпустите животное со стола.

7. Этикетка и т.д.

В качестве альтернативного метода в случае довольно крупных животных, таких как кролики и т.д., стерильный кусок стеклянной трубки подходящего диаметра может быть пропущен через гортань вниз по трахее почти до ее разветвления. Затем жидкие культуры могут быть буквально залиты в легкие, или культуры, высушенные и измельченные в порошок, могут быть вдуваемы в легкие с помощью небольшого ручного меха или даже сосковой пипетки.

10. Внутривентрикулярная инъекция.—*Жидкий или полужидкий инокулят. (Обезболивающих нет.)*

Метод выполнения операции незначительно варьируется в зависимости от размера подопытного животного.

А. Обезьяна, Кролик, Морская свинка.

1. Прикрепите животное к операционному столу брюшной поверхностью кверху.

2. Приоткройте рот кляпом; вытяните язык вперед щипцами.

3. Простерилизуйте мягкий резиновый катетер (№ 10 или 8 английской шкалы, или № 18 или 15 французской шкалы) и смажьте его стерильным глицерином.

4. Проведите им по задней стенке глотки, удерживая конец на средней линии.

5. Осторожно содействуйте продвижению катетера вниз по пищеводу, пока он не пройдет сердечное отверстие желудка. Не применяйте никакой силы.

6. Наберите необходимую дозу инокулята в стерилизованную пипетку. Вставьте кончик пипетки в открытый конец катетера и дайте жидкости стечь в желудок. Достаньте пипетку и опустите ее в банку с лизолом.

7. Другой стерильной пипеткой пропустите один кубический сантиметр стерильного физиологического раствора через катетер, чтобы смыть последние следы инокулята.

8. Извлеките катетер.

9. Этикетка и т.д.

Б. Крысы и мыши (метод Марка).

1. Зафиксируйте животное в вертикальном положении.

(а) *крыса*.—Возьмите пару зажимных синусовых щипцов длиной около 22 см и захватите животное за свободную кожу головы как можно дальше вперед—зафиксируйте щипцы и, держа инструмент вертикально вверх, передайте в левую руку ассистента, который фиксирует хвост животного между пальцами, сжимающими ручку щипцов. (См. рис. 191.)

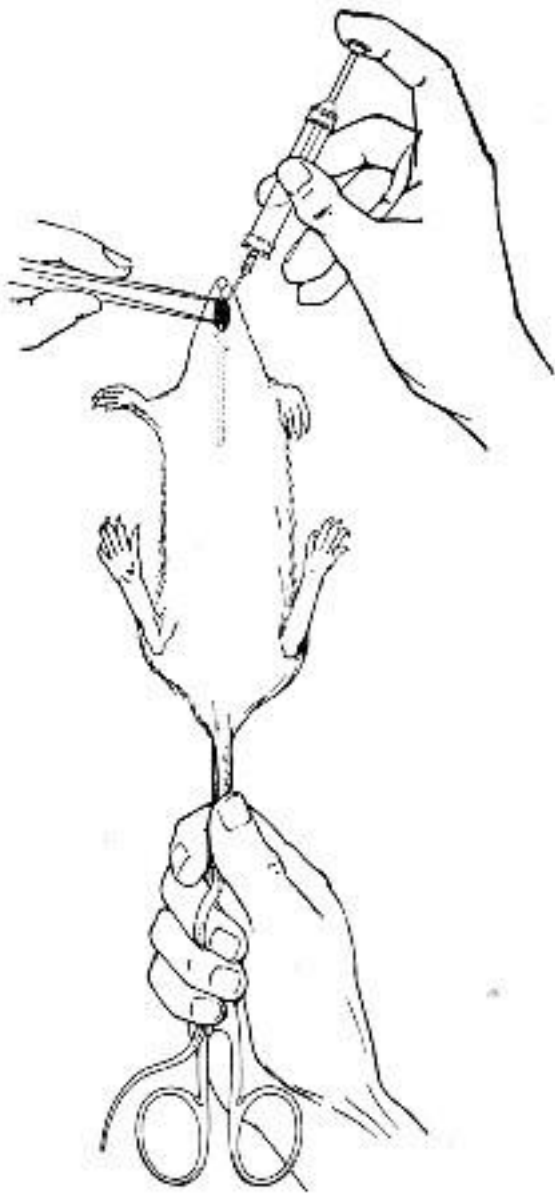


Рис. 191. Внутривентрикулярная инъекция крысе.

(б) *Мышь*.—Ассистент захватывает дряблую кожу между ушами как можно дальше вперед указательным и большим пальцами левой руки. Теперь он хватает мышку за хвост правой рукой, выпрямляет мышку, пропускает хвост между безымянным и мизинцем левой руки и закрепляет его там.

2. Ассистент берет в правую руку закрытые щипцы с тонкими лезвиями, вводит концы в рот животного, затем позволяет лезвиям отделиться. Это разжимает челюсть животного и служит кляпом.

3. Смочите стерилизованный пищеводный зонд стерильной водой. (Эта трубка из шелковой резины длиной 6,5 см с закругленным дистальным концом, проксимальный конец установлен в головке иглы шприца, которая подходит к соплам двух используемых стерильных шприцев.)

4. Возьмитесь за трубку примерно посередине и введите ее в рот животного, вниз и немного в одну или другую сторону, пока ее длина не исчезнет в пищеварительном тракте и полости рта. Необходимо только мягкое руководство. Не применяйте никакой силы.

5. Наберите необходимую дозу инокулята в шприц; вставьте наконечник шприца в крепление иглы и с усилием опустите поршень вниз.

6. Удерживая держатель иглы левой рукой, отсоедините шприц.

7. Наберите немного стерильной воды во второй (стерильный) шприц и, вставив его насадку в крепление иглы, выдавите несколько капель воды через трубку, чтобы промыть ее.

8. Одним быстрым движением вверх извлеките трубку изо рта животного.

9. Этикетка и т.д.

Остается описать еще один метод прививки, который не требует оперативного вмешательства.

11. Кормление.—

1. *Жидкий инокулят*.— Маленькие кусочки стерилизованного хлеба или соуса (стерилизованные в пароварке при 100°C) замачивают в жидком инокуляте и предлагают животным в стерильной чашке Петри или капсуле.

2. *Твердый инокулят*.— Небольшие кусочки ткани помещают в стерильные сосуды и предлагают животным.

СНОСКИ:

[12] Эта таблица составлена господами. Даун Бразерс, Сент-Томас-стрит, Лондон, Южная Каролина

[13] Это изменение внесено для автора господами. Даун Бразерс, Сент-Томас-стрит, Лондон, Южная Каролина

[14] Изготовлено господами. Фрэнсис Леппер, 56 лет, Грейт-Мальборо-стрит, Лондон, W.

XVIII. ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ТЕЧЕНИЕ ЖИЗНИ.

На наличие патогенетических свойств у исследуемого организма указывает "инфекция" экспериментального животного — термин, который используется для обобщения состояния, возникающего в результате успешной инвазии тканей экспериментального животного инокулированными микроорганизмами и их размножения в них. Считается, что заражение имело место:

1. Когда смерть животного наступает как прямое следствие прививки.
2. Когда прививка не обязательно приводит к смерти, она вызывает местные или общие изменения патологического характера.
3. При наступлении смерти или без нее, или при местных или общих изменениях в жидкостях организма появляются определенные вещества, которые, как можно показать (*in vitro* или *in vivo*), оказывают некоторый глубокий и специфический эффект при контакте с субкультурами первоначально привитого организма.

Важными факторами, способствующими возникновению инфекции, являются:

А. Семя. Вирулентность организма.
Доза для организма.

В. Почва. Устойчивость, оказываемая клетками подопытного животного.

Первые два фактора, хотя и изменчивы, в определенной степени находятся под контролем экспериментатора. Таким образом, с помощью подходящих средств вирулентность организма может быть повышена или ослаблена, в то время как размер дозы может быть увеличен или уменьшен. Третий фактор также различается не только у разных видов животных, но и у разных особей одного и того же вида. Существенные причины этих различий не столь очевидны, так что, помимо отбора животных, предназначенных для аналогичных экспериментов, с учетом таких факторов, как возраст, размер или пол, мало что можно сделать для стандартизации клеточной резистентности.

Сразу же после прививки животному должен быть начат период клинического наблюдения, который должен закончиться только со смертью животного. Сначала следует проводить общие наблюдения, а если инфекция острая, то ежедневно, а затем, если животное кажется незараженным или если инфекция хроническая, как общие, так и специальные наблюдения следует проводить с еженедельными интервалами. Если кажется, что животное все еще не поражено, по истечении двух-трех месяцев его следует умертвить парами хлороформа и провести полное вскрытие.

А. В **общих замечаниях** следует учитывать:

1. *Общий вид.* Подопытное животное следует осматривать ежедневно не только с целью выявления симптомов, связанных с экспериментальной инфекцией, но и для предотвращения

того, чтобы любая интеркуррентная инфекция, приобретенная естественным путем, осталась незамеченной (см. стр. 337).

2. Вес привитого животного следует контролировать и регистрировать каждый день в течение экспериментального заражения точно в одно и то же время, предпочтительно непосредственно перед утренним кормлением.

3. Температуру следует аналогичным образом регистрировать ежедневно, если не чаще, в течение всего периода наблюдения за животным и тщательно заносить на карту — индивидуальные колебания сразу станут очевидными. Следует иметь в виду, что температура, считающаяся нормальной для человека (37,5 ° C), не является нормальной средней температурой ни для одного из низших животных, за исключением крыс и мышей. Прилагаемая таблица средних значений нормы для животных, обычно используемых в бактериологических исследованиях, может быть полезна для предотвращения ошибочного предположения о наличии у животного пирексии, которая просто показывает его собственную нормальную температуру.

НОРМАЛЬНЫЕ СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ.

Животное.	Ректальная температура. ° C.	Пuls. Дыхание.	
		Скорость в минуту.	
Лягушка	8,9-17,2	80	12
Мышь	37,4	120	...
Крыса	37,5	...	210
Морская свинка	38,6	150	80
Кролик	38,7	135	55
Кошка	38,7	130	24
Собака	38,6	95	15
Коза	40,0	75	16
Бык	38,8	45	..
Лошадь	37,9	38	11
Обезьяна (резус)	38,4	100	19
Голубь	40,9	136	30
Домашняя птица	41.6	140	12

В. Особые указания включают некоторые или все из перечисленных ниже, в зависимости от метода прививки и характера вируса.

1. Место прививки следует тщательно осматривать, по крайней мере, с еженедельными интервалами, и пальпировать соседние лимфатические железы.

2. Любая местная реакция в месте прививки и на любом другом легкодоступном участке поражения должна быть тщательно исследована. Любой гнойный процесс, который может

возникнуть, будь то в подкожных тканях или в суставах, должен быть исследован, а гной тщательно исследован как микроскопически, так и культурально.

Жидкие выделения, такие как гной или серозный экссудат, при наличии доступа собираются непосредственно из организма в стерильные капиллярные пипетки (см. рис. 13а) следующим образом:

1. Откройте футляр с пипетками, возьмите одну из них за заглушенный конец, извлеките ее из футляра и установите крышку последней на место.
2. Прикрепите резиновую соску (видео стр. 10) к заглушенному концу пипетки и используйте соску в качестве ручки пипетки.
3. Дважды или трижды пропустите пипетку по всей длине через пламя горелки Бунзена.
4. Отщипните запечатанный конец пипетки стерильными щипцами.
5. Сожмите резиновую соску, вставьте кончик пипетки в выделяемый секрет; теперь ослабьте давление на сосок и дайте пипетке наполниться.
6. Извлеките наконечник пипетки из секрета, дайте жидкости пройти небольшое расстояние вверх по стержню капилляра и запечатайте наконечник пипетки в пламени. (При использовании пипетки с сужением ниже заглушенного мундштука (рис. 13b), эта часть пипетки также может быть закупорена в пламени.)

Когда будете готовы исследовать патологический материал, отщипните запечатанный конец пипетки стерильными щипцами и извлеките содержимое пипетки в стерильную капсулу. Теперь материал можно использовать для подготовки покровного слоя, культивирования и проведения экспериментов по прививке.

3. *Следует время от времени исследовать периферическую кровь*, поскольку из этой ткани часто получают самую полную информацию о течении инфекции.

а. Гистологическое исследование крови должно быть направлено главным образом на наблюдения за количеством и видом лейкоцитов; и поскольку лишь немногие бактериологи являются в то же время экспертами-сравнительными гематологами, для справки приведены некоторые примечания о нормальных характеристиках крови более обычных лабораторных животных, в отличие от крови человека. Они были любезно составлены для меня моим другом и бывшим коллегой доктором Сесилом Прайсом Джонсом.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГОМОЦИТОЛОГИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ.

животн ых	Итоговые		показатели					
	эритроц иты	лейкоци ты	НВ, процент ов.	Лимфоци ты, %.	Крупны е моноци ты, %.	Полиморфн ые, %.	Эозиноф ил, %.	Тучн ые клетк и, %.
Лягушка	490,000	8,000	58	40	10,0	22,0	15	13
Мышь	8,700,000	8,000	78	60	21,5	17,0	1,4	0,1

Крыса	9,000,000	9,000	85	54	7,0	37,5	1,3	0,2
Морская свинка	5,700,000	10,000	99	55	9,0	32,8	3,0	0,2
Кролик	6,000,000	7,000	70	50	2,0	46,0	0,6	1,4
Резус-фактор	4,500,000	13,000	77	43	5,0	50,0	1,3	0,7
Козы	14 600 000	15 000	58	35	6,3	56,7	1,25	0,75
Домашней птицы	3 500 000	30 000	100	49	3,0	42,0	1,0	5,0
Голубей	3 500 000	20 000	101	43	9,0	43,0	3,0	2,0
Нормы для взрослых мужчин.	5 000 000 (4,5-5) миллион ов.	7 500 (7-9) тысяч.	100 (95-101)	25 (20-30)	5,5 (4-8)	65 (55-68)	4,0 (3-5)	0,5 (0,5-2)

Приведенная выше таблица представляет в каждом конкретном случае среднее значение большого количества подсчетов.

Замечания.

Лягушка.—The *Эритроциты* представляют собой большие диски с овальным ядром (20-25 × 12-15 мкм), ядро относительно небольшое и неправильной удлиненной или овальной формы, около 10 мкм в длину. Обычно наблюдается множество примитивных и развивающихся форм — также свободные ядра и множество клеток на различных стадиях дегенерации. Определение содержания гемоглобина затруднено из-за мутности крови после разведения водой.

Полиморфноядерные лейкоциты представляют собой крупные клетки, около 20 мкм; четких гранул не наблюдается. *Эозинофильные* клетки содержат крупные глубоко окрашивающиеся гранулы кокковой формы.

*Мышь.*Гранулы *полиморфноядерных лейкоцитов* обычно не окрашены или окрашены очень слабо. Ядро *эозинофильной клетки* имеет кольцевидную форму или сильно разделено, а гранулы кокковые и окрашиваются оксифилом. Примечательной особенностью крови является высокий процент крупных *мононуклеарных* клеток.

Крыса.— Мелкие палочковидные гранулы *полиморфноядерных лейкоцитов* обычно окрашены очень слабо. Гранулы *эозинофильных* клеток хорошо окрашены и имеют кокковидную форму, ядро часто имеет кольцевидную форму. *Базофильных* гранулярных клеток немного, но гранулы крупные и окрашиваются глубоко базофильно.

Морская свинка. -Полихромазия и точечная базофилия эритроцитов очень часто наблюдаются — также часто встречаются эритроциты с ядрами. Большие *мононуклеарные* клетки часто содержат вакуоли — "клетки Курлоу" — возможно, паразитарной природы.

Кролик.—Нередко можно обнаружить зародышеобразующие эритроциты в пленках от вполне здоровых животных. Гранулы *полиморфноядерных* лейкоцитов окрашиваются оксифилом. Крупные гранулы *эозинофильных* клеток, по-видимому, окрашиваются оксифилом менее глубоко, вероятно, из-за базофильного окрашивания цитоплазмы.

Обезьяна-резус.—Клетки крови напоминают те, что встречаются в крови человека. Мельчайшие нейтрофильные гранулы *полиморфноядерных* лейкоцитов часто очень скудны, а иногда, по-видимому, отсутствуют. *Эозинофильные* клетки не так плотно заполнены грубыми оксифильными гранулами, как у эозинофилов человека, и ядра этих клеток обычно сильно разделены или полиморфны.

Козел.—The *Эритроциты* представляют собой маленькие безъядерные диски диаметром всего около 4,5 мкм, что ненамного больше половины размера эритроцитов человека. В *полиморфноядерных* лейкоцитах имеется всего несколько очень мелких оксифильных гранул кокковой формы, ядро полиморфное. *Эозинофильные* клетки представляют собой крупные клетки размером до 20 мкм, цитоплазма базофильная и содержит грубые оксифильные гранулы кокковой формы, а ядро часто сильно разделено.

Домашняя птица.—*Эритроциты* представляют собой овальные диски размером примерно 12 на 6 мкм с ядрами, ядро относительно небольшое (около 4 мкм длиной), неправильной удлинённости или овальной формы; часто присутствуют круглые, более глубоко окрашенные клетки с округлыми или диффузными ядрами, также свободные ядра и дегенерированные формы эритроцитов. Гранулы клеток, соответствующих *полиморфноядерным* лейкоцитам, имеют палочковидную форму, часто с бусинами или булавовидными концами. Ядро не полиморфно, но обычно разделено на два, хотя может быть и одиночным. Клетки, вероятно соответствующие *эозинофильным* лейкоцитам, имеют мелкие коккообразные гранулы, слабо окрашивающие эозинофилы или нейтрофилы. Базофильные гранулы "тучных" клеток имеют кокковидную форму, различного размера — часто довольно порошкообразные.

Голубь.—*Эритроциты* напоминают эритроциты домашней птицы, и могут быть отмечены сходные различия по внешнему виду. Гранулы тех клеток, которые соответствуют *полиморфноядерным* лейкоцитам, имеют палочковидную форму, но меньше и мельче, чем у домашней птицы, и не имеют складчатого вида. Ядро не полиморфно и лишь изредка делится. Коккообразные гранулы *эозинофильных* клеток более глубоко окрашены оксифилом, чем соответствующие клетки домашней птицы.

Приготовление высушенных пленок для данного гистологического исследования крови проводят следующим образом:

1. Небольшие образцы крови для приготовления кровяных пленок удобнее всего брать из ушных вен большинства обычных лабораторных животных, а именно обезьяны, козы, собаки, кошки, кролика, морской свинки; у голубя и домашней птицы следует проколоть подмышечную вену; у крысы и мыши - либо вену в ухе, либо предпочтительно путем порезания кончика хвоста; у лягушки следует выбрать перепонку лапки.

2. Проколите выбранную вену острой иглой. Плоская игла Хагедорна (размер № 8) с режущей кромкой является наиболее полезной для этой цели. Если вену невозможно растянуть проксимальным сжатием, желаемого эффекта может добиться сильное трение кусочком сухой ворсинки или рядом с веной можно поместить пробирку, наполненную водой с температурой около 40 ° С. В противном случае можно капнуть одну-две капли ксилола на кожу прямо над веной, оставить на несколько секунд, а затем вытереть кусочком сухой ворсинки.
3. Один из коротких концов стеклянной пластинки размером 3 на 1 приводят в соприкосновение с выступающей каплей крови, чтобы она собрала небольшую каплю.
4. Затем предметное стекло опускают поперечно на поверхность второго предмета размером 3 на 1, который опирается на скамью рядом с одним концом под углом примерно 45°, и удерживают в этом положении несколько секунд, пока капля крови не растечется по всей линии контакта (см. Также рис. 69).
5. Проведите первым слайдом ровно по всей длине нижнего слайда, оставляя тонкую правильную пленку, на которой, вероятно, будут видны клетки крови толщиной всего в один слой.
6. Дайте пленке высохнуть на воздухе.
7. Нанесите одно из полихромных пятен крови (см. стр. 97).
8. Исследуйте под микроскопом.

б. Бактериологическое исследование крови направлено исключительно на выявление присутствия в циркулирующей крови микроорганизмов, ранее введенных животному. Для этой цели несколько кубических сантиметров крови следует взять цельностеклянным шприцем из доступной вены, соответствующей одной из тех, которые предлагаются в качестве места внутривенной прививки, - и с соблюдением аналогичных мер предосторожности.

1. Простерилизуйте цельностеклянный шприц подходящего размера и, когда остынет, наберите в шприц немного стерильного раствора цитрата натрия и смочите всю внутреннюю поверхность цилиндра; затем извлеките весь раствор цитрата, если требуется забор крови менее 5 ° с; если требуется больше 5 ° с, оставьте в шприце около половины кубического сантиметра жидкости. Это предотвращает свертывание крови.

Раствор цитрата натрия готовят путем растворения:

Цитрат натрия	10 грамм.
Хлорид натрия	0,75 грамма.
В дистиллированной воде	при температуре 100 °с

Стерилизовать кипячением.

2. Подготовьте животное как для внутривенной прививки (см. стр. 363) и введите иглу шприца в просвет выбранной вены.
3. Медленно вытяните поршень шприца. Когда будет собрано достаточное количество крови, прикажите ассистенту ослабить проксимальную компрессию вены; и извлеките иглу.

4. Извлеките иглу из сопла шприца и перелейте цитратированную кровь в небольшую колбу Эленмейера, содержащую около 250 мл питательного бульона.

5. Маркируйте, инкубируйте и исследуйте ежедневно до начала роста или по истечении десяти дней.

с. **Серологическое исследование крови** направлено на демонстрацию присутствия определенных специфических антител в сыворотках экспериментально инфицированных животных и, в определенных пределах, на оценку их количества.

Руководителями этих органов являются:

Антитоксин.

Агглютинин.

Преципитин.

Опсонин.

Иммунное тело или бактериолизин.

Ни одно из этих веществ не может быть выделено в состоянии чистоты отдельно от сыворотки крови, следовательно, были разработаны специальные методы, позволяющие их распознавать. В каждом случае поведение сыворотки от экспериментального животного, которую можно назвать "специфической" сывороткой, изучается в сравнении с поведением сыворотки от некулированного животного того же вида, которое называется "нормальной" сывороткой. Ввиду незначительных различий в конституции, обнаруживаемых сывороткой различных особей одной и той же серии, обычно используют смесь сывороток, полученных от нескольких разных нормальных животных того же вида, что и привитое животное, под термином "объединенная сыворотка". Метод сбора крови (*например, у кролика*) для серологических тестов следующий:

Сбор сыворотки.

Требуемое устройство:

Бритва.

Жидкое мыло.

Вата.

Лизол 2%. раствор во флаконе для капель.

Эфир во флаконе для капель.

Плоские иглы Хагедорна.

Пипетки для крови (рис. 16, стр. 12).

Центробежная машина.

Центрифужные пробирки.

Нож для резки стекла.

Пламя Бунзена.

Пишущий алмазный или жирный карандаш.

Способ.

1. Побрейте тыльную поверхность уха по ходу задней ушной вены (см. рис. 192).

2. Простерилизуйте кожу, промыв ее лизолом.

Лизол следует наносить стерильной ватой и энергично растирать ухо не только для удаления поверхностных чешуек эпителия, но и для того, чтобы сделать ухо гиперемизированным и вену выступающей.

3. Извлеките лизол с добавлением эфира из флакона и дайте эфиру испариться.

4. Проколите вену стерильной иглой Хагедорна.

5. Возьмите маленькую пипетку для сбора крови (рис. 161) и держите ее под углом к уху, одним концом касаясь выступающей капли крови, а другим вдавливая.

Теперь кровь будет поступать в пипетку сначала капиллярно; затем также вступит в действие сила тяжести, и пипетка может быть без труда заполнена на две трети.

6. Держите пробирку за конец, содержащий кровь, чистым концом, направленным наклонно вверх — прогрейте этот конец на пламени бунзена, чтобы удалить часть содержащегося воздуха; затем закройте чистое место в пламени.

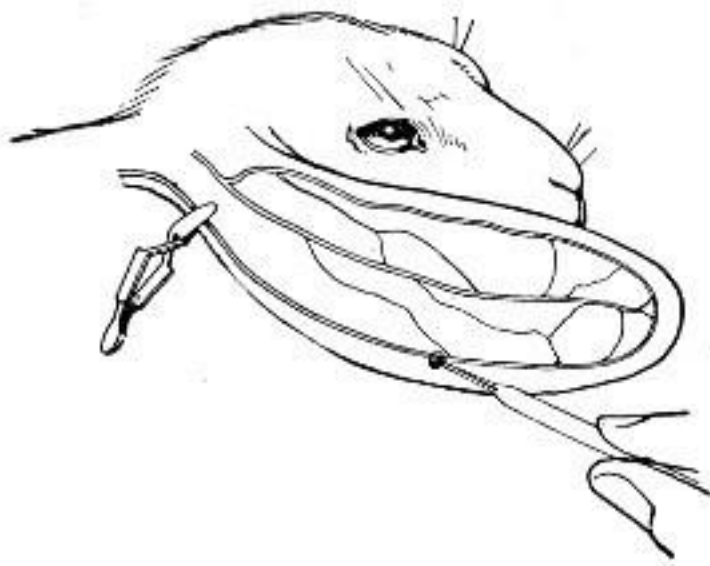


Рис. 192. Забор крови у кролика.

7. Поместите пипетку на прохладную поверхность (*например*, предметное стекло). Быстрое охлаждение воздуха на чистом конце пипетки создает отрицательное давление, и кровь всасывается обратно в пипетку, оставляя загрязненный конец свободным от крови. Замочите этот конец в пламени бунзена.

8. Отметьте отличительное название образца (*например*, номер животного) на пипетке ромбиком или жирным карандашом.

9. Когда запаянные кончики остынут и кровь свернется, поместите пипетку на центрифугу чистым концом вниз; уравновесьте и тщательно отцентрифугируйте. При извлечении пипетки из центрифуги эритроциты будут собраны с одного конца в твердую массу, а над ними появится прозрачная сыворотка.

10. Если сделать пометку на пипетке для крови над уровнем сыворотки стеклянным ножом для резки и защелкнуть пробирку в этом месте, сыворотка крови становится легкодоступной для целей тестирования.

Если требуется большее количество крови, животное после прокола вены следует перевернуть, при этом ассистент должен поддерживать его за ноги. Кровь объемом в несколько кубических сантиметров теперь будет капать из проколотов вены и должна быть собрана в сужающуюся центрифужную пробирку, которую переносят в инкубатор при 37 ° С на два часа, затем помещают в центрифужную машину, уравнивают и тщательно центрифугируют. Три наиболее важными из упомянутых антител, которые могут быть продемонстрированы с определенной степенью точности, являются агглютинин, опсонин и бактериолизин; и сейчас будут рассмотрены методы тестирования на наличие этих тел.

АГГЛЮТИНИН.

Агглютинин - это название, данное веществу, присутствующему в сыворотке крови животного, которое успешно сопротивлялось инокуляции определенным микроорганизмом. Это вещество обладает способностью собираться в комочки и массы или агглютинировать водянистые взвеси данного конкретного микроба.

Разбавление специфической сыворотки:

Требуемое оборудование:

Стерильные градуированные капиллярные пипетки вместимостью 10 мкм (рис. 17).

Стерильные градуированные капиллярные пипетки вместимостью 90 мкм (рис. 17).

Маленькие стерильные пробирки 5 × 0,5 см.

Физиологический раствор в колбе или пробирке.

Пипетка для специфической сыворотки.

Стеклянный нож для резки или трехквдратный напильник.

Стеклянная капсула, почти полная сухого серебристого песка, или рулон пластилина.

Смазочный карандаш.

Способ.—

1. Возьмите три стерильные пробирки и пронумеруйте их 1, 2 и 3.
2. Наберите пипеткой 0,9 стакана стерильного физиологического раствора в каждую пробирку и поставьте пробирки вертикально на песок в капсуле или в пластилиновом блоке.
3. Сделайте царапину стеклянным ножом для резки на пипетке для крови выше верхнего уровня прозрачной сыворотки, отщелкните и выбросьте пустую часть пробирки.
4. Извлеките 0,1 ч.л. сыворотки из пробирки для пипетки для крови и тщательно перемешайте ее с жидкостью из пробирки № 1; и пометьте **s.s.**(специфическая сыворотка), 10%.

5. Удалите 0,1 мл раствора из пробирки № 1 с помощью новой пипетки и смешайте его с содержимым пробирки № 2; на этикетке указано **s.s.**: 1%.

6. Удалите 0,1 мл раствора из пробирки № 2 с помощью новой пипетки и смешайте его с содержимым пробирки № 3; на этикетке указано, что **s.s.** 0,1%.

Когда выход сыворотки из образца крови, который был собран или доступен, невелик, описанный выше метод разбавления непрактичен, и разбавление следует проводить методом Райта с помощью капиллярной сосковой пипетки.

Разведение сыворотки с помощью сосковой пипетки.

Необходимые материалы:

Пипетка для взятия крови, содержащая образец специфической сыворотки после центрифугирования.

Капсула с разбавляющей жидкостью — физиологическим раствором.

Комплект пастеровских пипеток (рис. 13а).

Индия-резиновые соски.

Маленькие пробирки.

Кусок пластилина в качестве подставки для пробирок.

Смажьте карандаш.

Способ:

1. Отметьте три маленькие пробирки с содержанием 10%, 1% и 0,1%. соответственно, и поставьте их вертикально в пластилиновом блоке.

2. Возьмите пастеровскую пипетку, надрежьте стеклянном ножом стержень капилляра чуть выше запечатанного конца и быстрым движением отломите запечатанный конец так, чтобы излом получился ровным и под прямым углом к длинной оси стержня капилляра — фактически "квадратным". Приготовьте несколько, скажем, дюжину, таким образом.

3. Прикрепите резиновую соску к корпусу каждой из пипеток.

4. Сделайте отметку жирным карандашом на стержне одной из пипеток примерно в 2-3 см от открытого конца.

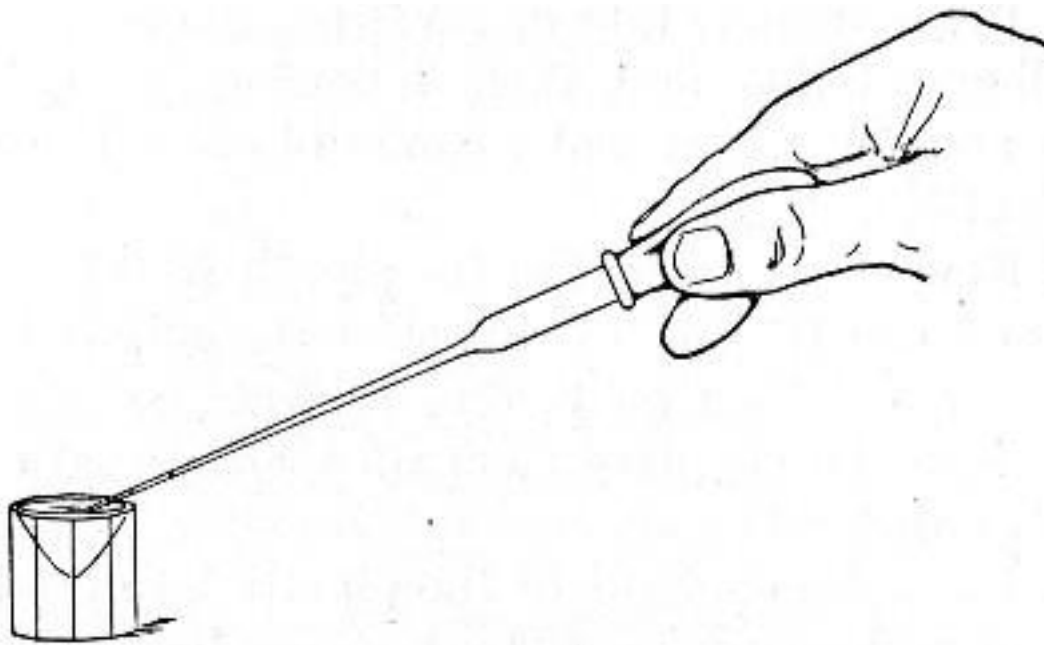


Рис. 193. Заполнение

капиллярной сосковой пипетки.

5. Сожмите соску между большим и указательным пальцами (рис. 193) до такой степени, чтобы вытеснить большую часть содержащегося воздуха.
6. Поддерживая давление на соску, вводите стержень пипетки в капсулу с физиологическим раствором до тех пор, пока открытый конец пипетки не окажется ниже уровня жидкости.
7. Теперь осторожно ослабьте давление на соску и дайте жидкости попасть в пипетку и подниматься по стержню, пока она не достигнет уровня отметки жирным карандашом. Как только эта точка будет достигнута, проверьте движение столба жидкости, поддерживая давление на сосок, не ослабляя и не увеличивая его.
8. Извлеките кончик пипетки из жидкости и снова очень слегка ослабьте давление на соску. Столбик физиологического раствора поднимается выше по стержню, и теперь в пипетку поступает столб воздуха, который служит указателем для отделения первого объема жидкости, втянутого в стержень, от следующего.
9. Снова опустите конец пипетки в жидкость и наберите второй объем физиологического раствора до уровня отметки жирным карандашом, а затем проведите второй воздушный указатель.
10. Аналогичным образом возьмите еще семь равных объемов физиологического раствора и следующие за ними пузырьки воздуха. Теперь в пипетке девять равных объемов физиологического раствора.
11. Теперь вставьте кончик пипетки в пробирку для сбора крови и опустите открытый конец под поверхность сыворотки. Продолжая, как и прежде, аспирируйте объем сыворотки в ножку капилляра до уровня карандашной отметки.
12. Извлеките содержимое пипетки в маленькую пробирку с маркировкой "10%". сжимая резиновую соску между большим и указательным пальцами.

13. Очень тщательно смешайте один объем сыворотки с девятью объемами физиологического раствора, многократно набирая всю жидкость в пипетку и снова переливая ее в пробирку.

14. Теперь возьмите чистую пипетку и действуйте точно так же, как раньше, от 4 до 10 раз.

15. Набрав девять равных объемов физиологического раствора во вторую пипетку, теперь наберите такой же объем жидкости из расчета "10 процентов". трубка".

16. Перелейте содержимое этой пипетки во вторую пробирку с маркировкой "1%". и тщательно перемешайте, как и раньше.

17. Аналогичным образом приготовьте 0,1%. раствор и перелейте в третью пробирку.

18. Таким же образом можно приготовить дополнительные разведения, кратные десяти, и, изменяя количество объемов разбавляющей жидкости или сыворотки, можно добиться любого требуемого разбавления (см. Приложение, Таблицы разведений).

Примечание.—Жидкость для разбавления физиологического раствора *всегда* следует набирать в пипетку первой, в противном случае, если сыворотка содержит очень большое количество агглютина, следов этой сыворотки, добавленной в физиологический раствор, может быть достаточно, чтобы полностью свести на нет последующие наблюдения —в то время как при разведении более чем одного образца сыворотки из одного и того же физиологического раствора в эксперименты могут быть внесены серьезные ошибки.

Микроскопическая реакция:

Требуемое устройство:

Пять подвесных слайдов (или предпочтительно два слайда) с двумя ячейками, установленными рядом на каждой (рис. 62, а), и один слайд только с одной ячейкой.

Вазелин.

Обложки.

Платиновая петля.

Жирный карандаш.

Культивирование в бульоне исследуемого организма в течение восемнадцати-двадцати четырех часов (*например*, *Bacillus typhi abdominalis*)

На конце пипетки находится остаток специфической сыворотки с надписью **s.s.**

Пробирки, содержащие три раствора специфической сыворотки - 10, 1 и 0,1%. соответственно.

На конце пипетки - объединенная нормальная сыворотка с надписью **p.s.**

Способ.—

1. Сделайте пять приготовлений для подвешивания, таким образом:

(а) Одна порция бульонного разведения + одна порция объединенной сыворотки; маркировка "Контроль".

(b) Одна петлевая культура + одна петлевая неразбавленная специфическая сыворотка; пометьте 50%.

Закрепите эти две наклейки на двухклеточном слайде.

(c) Одна ложка бульонной культуры + одна ложка 10%-ной. сыворотка; на этикетке указано 5%.

Установите это на предметное стекло с одной ячейкой.

(d) Одна ложка бульонной культуры + одна ложка 1%. сыворотка; на этикетке указано 0,5%.

(e) Одна ложка бульонной культуры + одна ложка 0,1%. сыворотка; указано 0,05%.

Закрепите эти две наклейки на двухклеточном слайде.

2. Обратите внимание на время: Осмотрите контрольный образец, чтобы определить, что бациллы подвижны и равномерно рассеяны по полю, а не собраны в массы.

3. Затем исследуйте 50%. препарат сыворотки.

Если присутствует агглютинин и тест дает положительную реакцию, бациллы *будут* собираться в большие комочки.

Если тест дает отрицательную реакцию, бациллы *могут* собираться в большие комки из-за вязкости концентрированной сыворотки.

4. Обратите внимание на 5%. препарат исследуйте под микроскопом.

Если бациллы собраны в комочки, реакция положительная.

Если бациллы *не* собраны в комочки, наблюдайте в течение тридцати минут с момента приготовления, прежде чем регистрировать отрицательную реакцию.

5. Изучите 0,5- и 0,05-процентные препараты. препараты.

Они могут показывать агглютинацию, а могут и не показывать, когда результат обследования составляет 5 процентов. препарат является положительным в соответствии с активностью специфической сыворотки; и путем исследования серии разведений может быть получено количественное сравнение валентности специфических сывороток из разных источников или сыворотки от одного и того же животного в разные периоды в ходе активной иммунизации.

Примечание.—Градированные пипетки, поставляемые с гематоцитометром Thoma (предназначенные для взятия образца крови, необходимого для подсчета лейкоцитов), дающие разведение 1 к 10 — *т. е.* 10%. — могут быть заменены градуированными капиллярными пипетками, упомянутыми выше, если сосуд, в котором была отделена сыворотка, имеет достаточно большой диаметр, чтобы можно было их использовать.

Макроскопическая реакция:

Стерильные градуированные капиллярные пипетки емкостью 90 мкм

Культивирование бульона в организме, подлежащем тестированию, в течение восемнадцати-двадцати четырех часов.

Три пробирки, содержащие 10, 1 и 0,1%-ный растворы специфической сыворотки (в каждой остается около 90 мкмоль/л),,,.

Пробирка, содержащая 50%-ный раствор объединенной сыворотки.

Пипетки для осаждения (*смотрите* стр. 17) или сосковые пипетки.

Способ.

1. Наберите пипеткой 90 миллиметров бульонной культуры в каждую из пробирок, содержащих разведенную сыворотку; и такое же количество в пробирку, содержащую объединенную сыворотку.
2. Наполните содержимым каждой пробирки отстойник (путем аспирации) или сосковую пипетку. Заделайте нижние концы отстойных трубок в пламени Бунзена.
3. На этикетке каждого тюбика указано разведение сыворотки, которое в нем содержится, а именно: 5, 0,5 и 0,05%.
4. Поместите пипетки в вертикальном положении, в мензурку, в инкубатор при температуре 37 °C, на один или два часа.
5. Обратите внимание на гранулированный осадок, который выпадает при положительной реакции, и равномерную мутность отрицательной реакции по сравнению с показателями в контрольной объединенной сыворотке.

ОПСОНИН.

Опсонин - это термин, применяемый Райтом к веществу, присутствующему в сыворотке крови привитого животного, которое способно воздействовать на бактерии первоначально введенного вида или повышать их чувствительность, чтобы сделать их легкой добычей для фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов. В способе демонстрации опсонина, который будет описан ниже, проводится сравнение опсонической "мощности" объединенной сыворотки и специфической сыворотки.

Устройство:

Небольшая центрифуга и пробирки для нее (изготавливаются из цилиндров сломанных капиллярных пипеток путем герметизации конических концов в пламени бунзена).

Капиллярные пастеровские пипетки.

Индия-резиновые соски.

Жирный карандаш.

Горелка Бунзена с пищущим пламенем.

Электрические сигнальные часы (см. стр. 39) секундомер или наручные часы.

Прямоугольная стеклянная коробка или лоток для хранения пипеток.

Инкубатор регулируется при температуре 37°C.

слайды размером 3 × 1.

Кусок легкой резиновой трубки.

Прямоугольный брусочек пластилина.

Флакон с обычным физиологическим раствором.

Флакон цитрата натрия (1,5%) в обычном физиологическом растворе.

Необходимые материалы и их подготовка:

Небольшая пробирка с "отмытыми клетками" (эритроцитами и лейкоцитами); клетки человека используются для оценки опсонизирующей способности сыворотки экспериментальных животных.

Небольшой тюбик с эмульсией бактерий вида, ответственного за заражение экспериментального животного.

Пипетка для взятия крови, содержащая специфическую сыворотку.

Пипетка для взятия крови, содержащая "объединенную" сыворотку.

Промытые клетки.—

1. Возьмите небольшую центрифужную пробирку и наполовину заполните ее раствором цитрата натрия. Отметьте жирным карандашом верхний предел жидкости.

2. Очистите кожу дистальной фаланги второго пальца левой руки над корнем ногтя ворсом и эфиром. Плотнo обмотайте резиновую трубку вокруг второй фаланги; проколите стерильной иглой Хагедорна очищенный участок кожи.

3. Возьмите достаточное количество выделяемой крови (больше или меньше в зависимости от количества анализов, которые необходимо выполнить) с помощью пипетки, перелейте ее в пробирку с цитратным раствором и тщательно перемешайте. Сделайте вторую отметку на пробирке на верхнем уровне смешанного раствора цитрата и крови.

4. Поместите пробирку в центрифугу, аккуратно уравновесьте и центрифугируйте до тех пор, пока клетки крови не соберутся в компактную массу, занимающую примерно тот же объем, что указан между двумя карандашными пометками.

В столбике жидкости в пробирке теперь видна прозрачная надосадочная жидкость (раствор цитрата и плазма крови), отделенная от резко срезанной верхней поверхности отложения красных кровяных телец узким сероватым слоем лейкоцитов.

5. Удалите столбик надосадочной жидкости с цитратным раствором с помощью сосковой пипетки, налейте физиологический раствор в пробирку до верхней отметки карандашом и распределите клетки крови по физиологическому раствору с помощью сосковой пипетки. Центрифугируйте, как и раньше.

6. Снова удалите надосадочную жидкость, залейте свежий физиологический раствор и еще раз центрифугируйте.

7. Удалите надосадочный физиологический раствор настолько низко, насколько это возможно безопасно без удаления лейкоцитов.

8. Затем равномерно распределите лейкоциты по массе эритроцитов, вращая пробирку между ладонями — точно так же, как это делается с пробиркой со сжиженной средой перед заливкой в тарелку.

9. Установите трубочку вертикально в пластилиновом блоке ближе к одному концу.

Бактериальная эмульсия.—

1. Возьмите 18-24-часовую культуру требуемой бактерии (*например, Diplococcus pneumoniae*), выращенную на наклонном кровяном агаре при 37°C. Налейте на поверхность среды примерно 5°с обычного физиологического раствора.

2. С помощью платиновой петли эмульгируйте рост с поверхности среды как можно более равномерно в физиологическом растворе.

3. Дайте пробирке постоять несколько минут, чтобы крупные образования могли осесть; перенесите верхнюю часть солевой суспензии в центрифужную пробирку и тщательно отцентрируйте.

4. Исследуйте каплю надосадочной жидкости с опалесцирующей эмульсией под микроскопом, чтобы определить, нет ли в ней комков и масс. Если результат неудовлетворителен, приготовьте другую эмульсию, на этот раз соскребите поверхностный нарос платиновым шпателем, перенесите его в агатовую ступку и растолките последовательно небольшими количествами физиологического раствора. Если это удовлетворительно, вставьте тубик в пластилиновый блок рядом с блоком с промытыми клетками.

Специфическая сыворотка.—

Объединенная сыворотка.—

Эти сыворотки собирают и обрабатывают, как уже описано (см. стр. 379), а содержащие их части пипеток для крови укладывают в оставшееся пространство пластилинового блока.

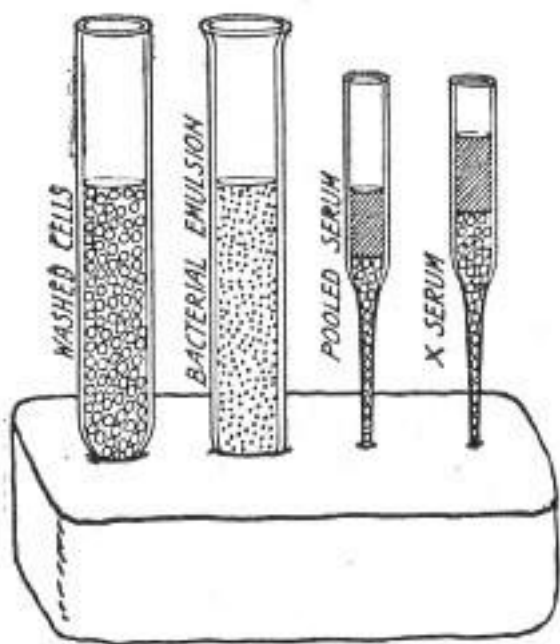


Рис. 194.— Пластилиновый блок с материалами, расположенными для оценки опсонина.

Теперь пластилиновый блок имеет вид, показанный на рис. 194.

Способ определения опсонического индекса.—

1. Возьмите капиллярную пипетку с насадкой, отрежьте дистальный конец *квадратным* образом и сделайте карандашом отметку примерно в 2 см. от конца.
2. Отсосите в пипетку один объем промытых клеток с индексом воздуха, один объем бактериальной эмульсии с индексом воздуха и один объем специфической сыворотки (см. рис. 195).

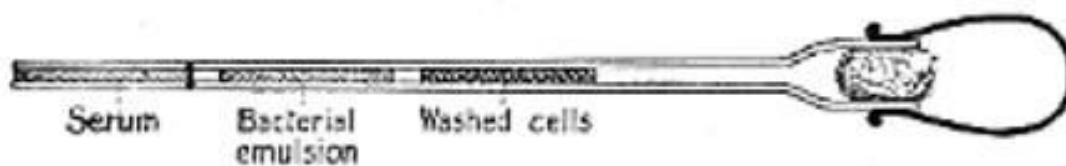


Рис. 195. Пипетка

с опсономом.

3. Тщательно перемешайте на предметном стекле размером 3 на 1, сжимая соску и выталкивая содержимое пипетки на поверхность предметного стекла, ослабляя давление и таким образом снова втягивая жидкость в пипетку. Эти два процесса следует повторить несколько раз; наконец, подайте смесь непрерывной колонной к центральной части капиллярного стержня.
4. Поместите кончик пипетки в язычок пламени горелки бунзена и извлеките соску.
5. Отметьте на пипетке (жирным карандашом) отличительный номер сыворотки и поместите ее в стеклянную коробку или лоток.
6. Возьмите другую аналогично подготовленную пипетку и отсосите в нее равные объемы отмытых клеток, бактериальной эмульсии и объединенной сыворотки. Обработайте точно так

же, как показано в пунктах 3 и 4, пометьте "контрольная" или "N.S." (обычная сыворотка) и положите в коробку рядом со специальным препаратом сыворотки.

7. Поместите коробку с пипетками в инкубатор и установите сигнальные часы на 15 минут (или включите секундомер).

8. По истечении времени инкубации извлеките пипетки из инкубатора.

9. Отрежьте запечатанный конец специального препарата сыворотки. Тщательно перемешайте его содержимое, как в шаге 3, а затем разделите смесь на две пластинки размером 3 на 1 и аккуратно нанесите пленку крови (*видео*, стр. 376) на каждую таким образом, чтобы кровью была покрыта только половина поверхности каждого предметного стекла - свободный край пленки крови приблизительно совпадал с продольной осью предметного стекла.

Дайте пленкам высохнуть и наклейте на слайды надпись ромб.

10. Обработайте содержимое контрольной пипетки аналогичным образом.

11. Выберите лучшую пленку из каждой пары для фиксации и окрашивания.

12. Фиксация и окрашивание должны выполняться в строго сопоставимых условиях, и с этой целью с предметными стеклами лучше всего обращаться, помещая их в подставку для окрашивания стекла, которую можно по очереди опускать в каждую из серии стеклянных ванн, содержащих различные реагенты (рис. 196). Поместите решетку в первую емкость, содержащую спиртовой раствор морилки Лейшмана, на две минуты для закрепления.

Перенесите во вторую ванночку с разведенным красителем на десять минут.

Переложите в третье корыто с дистиллированной водой и, держа корыто над раковиной, пропускайте струю дистиллированной воды до завершения промывки. Снимите горки с подставки и высушите.

Краска Лейшмана лучше всего подходит для обычной работы со всеми бактериями, кроме *B. tuberculosis*. Пленки, содержащие туберкулезные палочки, разумеется, должны быть окрашены по методу Циля Нельсена.

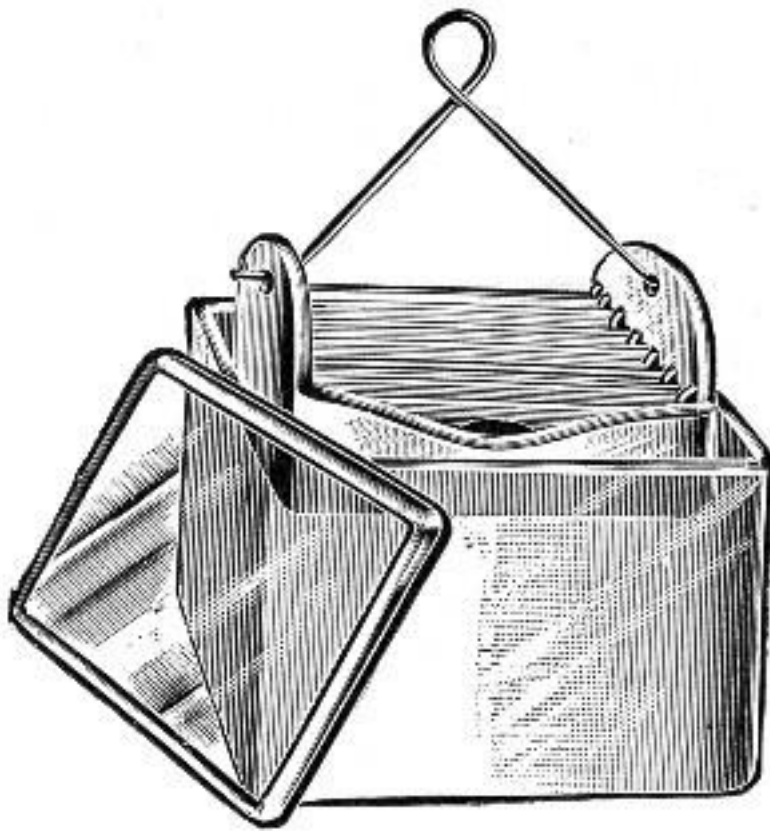


Рис. 196. Стекланный желоб для

окрашивания пленок крови.

13. Исследуйте предметное стекло сыворотки под микроскопом с погружением в масло на 1/12 дюйма. Найдите край пленки крови — по нему будет собрана основная масса лейкоцитов. Начиная с одного конца пленки, медленно перемещайте предметное стекло под микроскопом и по мере того, как каждый лейкоцит попадет в поле зрения, подсчитывайте и записывайте количество проглоченных бактерий. Сумма содержаний первых 50 встречающихся подряд полиморфноядерных клеток проставляется в обратном порядке. (Среднее количество проглоченных бацилл на лейкоцит = "фагоцитарный индекс".)

14. Точно таким же образом перечислите бактерии, присутствующие в первых 50 клетках контрольного препарата. Это число записывается как знаменатель обычной дроби, числителем которой является число, зарегистрированное для конкретной сыворотки. Эта доля, выраженная в процентах от единицы, = *опсоническому индексу*.

ИММУННЫЙ ОРГАН.

Иммунное тело или амборецептор - это название, данное веществу, присутствующему в сыворотке крови инфицированного животного, которое успешно сопротивлялось инокуляции каким-либо конкретным микроорганизмом и которое обладает способностью связывать комплемент, обычно присутствующий в сыворотке, с бактериями вида, используемого в качестве антигена, таким образом, что микроорганизмы становятся безвредными и в конечном итоге уничтожаются. Присутствие иммунных телец в сыворотке крови может быть продемонстрировано *in vitro* с помощью реакции, разработанной Борде и Генгу, известной как тест фиксации комплемента, при этом наличие или отсутствие феномена фиксации комплемента становится очевидным макроскопически по отсутствию или наличию гемолиза

при последующем добавлении "сенсibilизированных" красных кровяных телец (*например*, смесь раствора эритроцитов и соответствующего гемолизина — двух из трех основных веществ в гемолитической системе, *смотрите* на странице 326).

Требуемое устройство:

Стерильные пипетки по 1 ст.л. (градуированные в десятых долях).

пробирки размером 16 × 2 см.

пробирки размером 9 × 1 см.

Подставки для пробирок для пробирок любого размера.

Необходимые реагенты:

Обычный физиологический раствор.

Раствор эритроцитов (эритроциты человека, стр. 329) = E.

Гемолитическая сыворотка (для клеток человека) = H.S.

Комплемент (свежая сыворотка морской свинки) = C.

Специфическая сыворотка от привитого животного, инактивированная = S.S.

Контрольная объединенная сыворотка от нормальных животных того же вида, инактивированная = P.S.

Антиген (культивирование на твердой среде организма (*например*, *B. typhosus*), который уже служил антигеном при прививке экспериментальному животному) = A.

Чтобы подготовить антиген к использованию, эмульгируйте весь бактериальный рост в 5-градусном физиологическом растворе.

Взбейте эмульсию в пробирке с несколькими стерилизованными стеклянными шариками, чтобы получить однородную эмульсию, и стерилизуйте, нагревая до 60 ° C на водяной бане в течение одного часа.

Способ.—

1. Возьмите пять маленьких пробирок и пронумеруйте их от 1 до 5 жирным карандашом.
2. В пробирки № 1, 3, 4 и 5 ввести пипеткой 0,1 мл комплемента.
3. В пробирки № 1 и 2 наберите пипеткой 0,2 стакана исследуемой сыворотки.
4. В пробирку № 4 наберите пипеткой 0,2 стакана контрольной сыворотки.
5. В пробирки № 1, 2, 3 и 4 введите пипеткой 1 каплю бактериальной эмульсии, которая образует антиген.
6. Поместите весь набор пробирок в инкубатор при температуре 37 ° C сроком на один час.

7. Извлеките пробирки из инкубатора и наберите в каждую пробирку 1 ст.л. раствора эритроцитов и 4 минимальные дозы соответствующего гемолитика - гемолизина.
8. Тщательно перемешайте и верните пробирки в инкубатор при температуре 37 ° C еще на один час.
9. По истечении этого времени переложите тубики в морозильную камеру и дайте им постоять три часа.
10. Осмотрите пробирки.

Пробирки 3, 4 и 5 должны показывать полный гемолиз; в пробирке 2 не должно быть никаких признаков гемолиза.

Эти пробирки служат контрольными для первой пробирки, содержащей тестируемую сыворотку.

В пробирке № 1 отсутствие гемолиза указывало бы на присутствие в сыворотке привитого животного специфического антитела к микроорганизму, используемому при прививках; поскольку это показывает, что иммунный организм связал комплемент с бактериальным антигеном, и ни один из них не остался свободным для поступления в гемолитическую систему; с другой стороны, наличие гемолиза показывало бы, что в ответ на прививки еще не образовалось заметное количество антител. Другими словами, инфекция отсутствует, поскольку комплемент оставался нефиксированным во время добавления раствора эритроцитов и гемолитической сыворотки и был готов к соединению с этими реагентами для завершения работы гемолитической системы.

Метод может быть показан схематически, как показано ниже, с использованием уже указанных символов

Test-tubes.				
①	②	③	④	⑤
0.1 c.c. C.		0.1 c.c. C.	0.1 c.c. C.	0.1 c.c. C.
0.2 c.c. S.S.	0.2 c.c. S.S.		0.2 c.c. P.S.	
A.	A.	A.	A.	
Incubate at 37° C. for one hour.				
1 c.c. E.	1 c.c. E.	1 c.c. E.	1 c.c. E.	1 c.c. E.
H.S. ⁴	H.S. ⁴	H.S. ⁴	H.S. ⁴	H.S. ⁴
Incubate at 37° C. for one hour.				
(?)	No hæmolysis.	Hæmolysis.		

Примечание.—Иногда удобнее *сенсibilизировать* эритроциты непосредственно перед тем, как они понадобятся. Это делается через сорок пять минут после начала эксперимента (стр. 394, шаг 6), то есть до завершения первого периода инкубации, таким образом:

1. Отмерьте в стерильную пробирку (или колбу) пять мл раствора эритроцитов.
 2. Отмерьте двадцать минимальных гемолитических доз гомолизина, добавьте в раствор эритроцитов в пробирке.
 3. Дайте эритроциту и гомолизину оставаться в контакте в течение пятнадцати минут при комнатной температуре. Затем эритроциты сенсibilизированы и готовы к использованию.
 4. Когда пробирки будут извлечены из инкубатора по истечении первого часа (*т. е.*, этап 7), добавьте по 1 капле сенсibilизированных эритроцитов в каждую пробирку с помощью градуированной пипетки.
 5. Тщательно перемешайте, верните пробирки в инкубатор при температуре 37 ° С. и завершите эксперимент, как описано ранее (шаги 8 и далее).
-

ХІХ. ПОСМЕРТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ.

Вскрытие следует проводить как можно скорее после смерти животного, поскольку необходимо помнить, что даже в холодную погоду ткани быстро поражаются многочисленными бактериями, происходящими из пищеварительного тракта или полостей тела, а также из внешних источников.

Приведенные ниже рекомендации относятся к полному и исчерпывающему вскрытию, и при обычной работе редко возникает необходимость в проведении полного обследования.

Примечание.—На протяжении всего вскрытия необходимо свободно пользоваться обжигающими утюгами, и следует помнить, что один инструмент должен использоваться только для захвата или разрезания одной структуры. После этого его следует рассматривать как загрязненный и использовать новый инструмент для следующего шага.

Требуемое устройство:

Стерилизатор воды.

{ Скальпели.

Хирургические инструменты: { Ножницы.

{ Щипцы.

{ Костные щипцы.

Платиновый шпатель с острым наконечником (рис. 199).

Обжигающие утюги (рис. 198).

Трубочки с питательной средой—бульоном и наклонным агаром.

Поверхность пластинок в чашках петри (из агара или одного из его производных).

Платиновая петля.

Алюминиевый "разбрасыватель".

Жирный карандаш.

Стерильные капиллярные пипетки (рис. 13, а).

Стерильные стеклянные капсулы, большие и маленькие.

Обложки или слайды.

Флаконы с фиксирующей жидкостью (*видео*, стр. 114) для кусочков ткани, предназначенных для разрезания.

1. Поместите различные инструменты, пинцеты, ножницы, скальпели и т.д., необходимые для вскрытия, внутрь стерилизатора и стерилизуйте кипячением в течение десяти минут; затем откройте стерилизатор, поднимите лоток изнутри и поставьте его крест-накрест по краям.

2. Нагрейте утюжки для обжига до красноты на отдельной газовой плите.

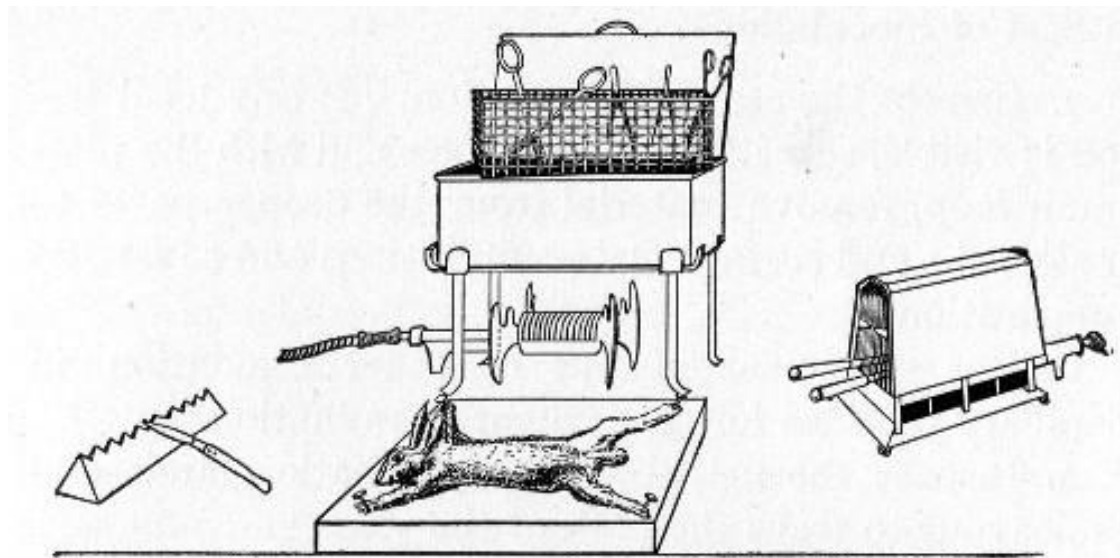


Рис. 197.

Устройство для вскрытия, животное на борту.

3. Смочите мех (или перья) 2-процентным раствором лизола. Это служит двоякой цели: предотвратить разлет волосков и попадание в полости тела во время вскрытия, а также обезвредить любых паразитов, которые могут присутствовать на животном.



Рис. 198. Раскаленное железо.

4. Тщательно осмотрите труп. Помните, что лабораторные животные не всегда выносливы; смерть может наступить из-за воздействия жары или холода, голода, чрезмерного или неправильного кормления или нападения крыс, а не из—за бактериальной инфекции.
5. Прикрепите тело животного брюшной поверхностью вверх (если нет какой-либо особой причины для оголения спины) к доске с помощью медных гвоздей, вбитых в конечности.
6. Стерильными щипцами и скальпелем надрежьте кожу по средней линии от верхней части грудины до лобка. Сделайте другие надрезы под прямым углом к первому, к подмышечным впадинам и паху, и отделите кожу двумя боковыми лоскутами. (Положите зараженные инструменты на доску сбоку от корпуса или поставьте их на фарфоровую подставку для ножей.)

Место прививки.—

7. Осмотрите место прививки. Если видно какое-либо локальное повреждение, прижгите его открытую поверхность и с помощью платиновой петли удалите материал из более глубоких частей, чтобы произвести культивирование трубки и поверхностной пластины и подготовить покрытие к скольжению.

Соберите образцы гноя или другой экссудации в капиллярные пипетки для последующего исследования.

8. Осмотрите соседние лимфатические узлы и постарайтесь проследить путь распространения вируса.
9. Прижгите всю открытую поверхность грудной клетки обжигающими утюгами.

Плевральная полость.—

10. Разделите ребра по обе стороны грудины и удалите прямоугольный участок передней грудной стенки стерильными ножницами и свежими щипцами, обнажив сердце. Поместите зараженные инструменты рядом с первым набором.
11. Понаблюдайте за состоянием желез переднего средостения, вилочковой железы и легких. Наберите некоторое количество плевритного выпота, если таковой имеется, в пипетку для дальнейшего исследования позже.
12. Приподнимите перикардиальный мешок свежими щипцами и прожгите эту структуру раскаленным железом.

Соберите образец перикардиальной жидкости в пипетку для микроскопического и культурального исследования.

13. Возьмитесь щипцами за верхушку сердца и прижгите поверхность правого желудочка.
14. Опустите открытый кончик капиллярной пипетки через обожженный участок в желудочек и наполните его кровью.

Производить культивирование и укрывные препараты сердечной крови.

15. Возьмите еще один образец крови или сыворотки для последующего исследования на наличие антител.

Брюшная полость.—

16. Прожечь широкий след по средней линии брюшной стенки; вскрыть брюшную полость разрезом по центру прожженной линии. Обратите внимание на состояние сальника, брыжейки, внутренних органов и брюшинной поверхности кишечника.

17. Соберите образец перитонеальной жидкости (или гноя, если таковой имеется) в капиллярную пипетку. Исходя из этого, подготовьте культиваторы, трубки и поверхностные пластины, а также защитные покрытия.

18. Возьмите образец мочи из расширенного мочевого пузыря большой пипеткой (способом, указанным для анализа крови из сердца) для дальнейшего исследования с помощью культивирования, микроскопических препаратов и химического анализа.

19. Возьмите образец желчи из желчного пузыря аналогичным образом.

20. Иссежьте селезенку и поместите ее в стерильную капсулу. Позже опалите поверхность этого органа; воткните остроконечную лопаточку в центр опаленного участка, поверните ее между большим и указательным пальцами и извлеките из органа. Из глаза в его головку будет удалено достаточное количество материала для культивирования. Повторение процесса даст материал для подготовки покровных накладок.

21. Захватите один конец селезенки стерильными щипцами. Иссошите узкую полоску ткани прямо вокруг органа и в этом случае разделите селезенку ножницами. Удерживая кусочек селезенки пинцетом, нанесите поверхность среза на пластинку в нескольких разных местах.

22. Аналогичным образом осмотрите другие органы — печень, легкие, почки, лимфатические железы (брыжеечную, печеночную, поясничную и т.д.) и т.д. Подготовьте почву для культивации и укрывные средства.

23. Отделите длинную кость от одной верхней и одной нижней конечности и одного из самых крупных ребер. В каждом случае подготовьте культуры костного мозга. Отложите эти косточки для последующего приготовления пленок из костного мозга.

24. Пленочные препараты костного мозга лучше всего изготавливать методом Прайса-Джонса. Возьмите кость плоскогубцами и выдавите немного костного мозга; соберите его в платиновую петельку и перенесите в часовое стекло с диссоциирующей жидкостью для эмульгирования. Диссоциирующая жидкость нейтральная, 10%. раствор глицерина готовят следующим образом:—

Отмерьте 10 г лучшего по цене глицерина и 90 г стерильной дистиллированной воды без аммиака. Перемешайте. Титруют против $n/10$ раствора гидрата натриевой кислоты, используя фенолфталеин в качестве индикатора. Начальная реакция обычно составляет от + 0,1 до + 0,5; для нейтрализации добавьте расчетное количество раствора $n/10$ гидрата натрия.

25. На предметное стекло размером 3×1 нанесите каплю свежей осушающей жидкости; добавьте такую же каплю эмульсии для костного мозга и очень аккуратно распределите по поверхности капельки.

26. Дайте пленке высохнуть на воздухе (защищенном от пыли) без нагрева.

27. Окрашивайте полихромной краской Дженнера (стр. 97) в течение двух с половиной минут.

28. Промойте дистиллированной водой без аммиака, тщательно высушите и вотрите в ксилоловый бальзам.

Полости черепа и позвоночника.—

29. В некоторых случаях может потребоваться (*например*, экспериментальная прививка от бешенства) обследование полости черепа или удаление спинного мозга. Верните внутренности в брюшную полость; стяните лоскуты кожи вместе и закрепите стальными зажимами Michel. Вытяните медные гвозди, которыми конечности крепятся к доске, переверните животное и снова прибейте конечности гвоздями вниз — теперь туловище должно находиться спинной частью вверх.

30. Сделайте продольный разрез по мезиальной линии от морды до основания хвоста и четыре поперечных разреза — один, соединяющий корни двух ушей, один поперек тела на уровне позвоночника лопаток, другой на уровне реберного края и последний поперек верхнего уровня таза. Отрастите эти лоскуты кожи.

31. С помощью щипцов и скальпеля рассеките мышцы, лежащие в борозде по обе стороны от позвоночных отростков.

32. Прорежьте основания поперечных отростков костными щипцами. Срежьте свод черепа, перережьте корешки нервов и извлеките головной и спинной мозг, поместите в большую стеклянную посуду для исследования. Подготовьте образцы спинномозговой жидкости. Удаление головного мозга и спинного мозга - трудоемкий процесс, и во время вскрытия трудно избежать повреждения этих структур.

Однако операция выполняется очень быстро и аккуратно с помощью хирургического механизма (*видео*, стр. 361). К ручному наконечнику прикреплена небольшая циркулярная пила. Кости черепа разрезаются насквозь, и весь свод удаляется, обнажая всю вершину мозга. Аналогичным образом все остистые отростки можно удалить за один ряд, проведя пилой сначала по одной стороне позвоночного столба, а затем по другой. Таким образом, получается достаточно места для удаления нервных тканей с минимальными затратами труда.

33. Завершив приготовление культур, на досуге извлеките небольшие порции различных органов и поместите каждый в отдельные флаконы с фиксирующей жидкостью для будущих срезов. Прикрепите к каждой бутылке этикетку со всеми необходимыми сведениями о ее содержимом.

34. При необходимости извлеките части органов для сохранения и показа в качестве музейных экспонатов (*видео*, стр. 404).

35. Соберите все зараженные инструменты, верните их в стерилизатор и продезинфицируйте кипячением в течение десяти минут.

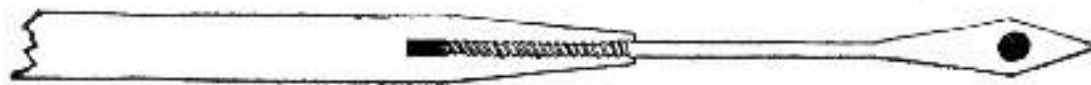


Рис. 199.

Платиновый шпатель с острым наконечником (реальный размер)

36. Насыпьте сухих опилок в открытые полости тела, чтобы они впитали кровь и жидкость. Накройте тело промокательной или фильтровальной бумагой, смоченной 2-процентным раствором лизола. Поместите в ведро из оцинкованного железа с крышкой, готовое к транспортировке в крематорий.
37. Кремируйте труп вместе с доской, к которой он прикреплен.
38. Испачкайте покровные листы подходящими методами и исследуйте под микроскопом.
39. Инкубируйте культуры и тщательно исследуйте изо дня в день.
40. Сразу после завершения вскрытия сделайте подробные записи о состоянии различных полостей тела и внутренних органов; и добавьте результаты микроскопического и культурального исследования, если таковые имеются.

В рамках картотечной системы, используемой в уже упоминавшейся лаборатории автора (видео, стр. 335), существует специальная желтая карточка для заметок Р-М. На лицевой стороне карточки напечатаны заголовки для различных данных, некоторые из которых иногда непреднамеренно опущены, а на обратной — схематический рисунок, который может быть использован для обозначения расположения основных очагов поражения на трупе любого из лабораторных животных.

AUTOPSY CARD.			Laboratory No.
Animal	Date	No. in Series	Weight
Died (or killed).....o'clock.....m.		Autopsy made o'clock . . . m.	
Notes on Post Mortem Examination.			
General.			
A. Seat of Inoculation.			
B. Thoracic Cavity.			
C. Abdominal Cavity.			
D. Cranial Cavity.			
Bacteriological Examination.		Histological Examination.	Organs Preserved.
A.			
B.			
C.			
D.			

Рис. 200.—

Лицевая сторона посмертной карточки.

41. Наконец, результаты действия выделенного организма или организмов могут быть соотнесены с симптомами, наблюдаемыми при жизни, и наблюдениями, обобщенными под следующими заголовками:

Изменения в тканях:

1. Местный —т.е.вырабатываемый по соседству с бактериями.

Положение: (a) В месте первичного поражения.

Характер:	(b) При вторичных очагах. (a) Сосудистые изменения и тканевые реакции.} (b) Дегенерация и некроз.}	Острый или хронический.
2. Общие (т.е. вырабатываемые на расстоянии от бактерий в результате поглощения токсинов):	(a) В специальных тканях —<i>например</i>, нервных клетках и волокнах, секретирующих клетках, стенках сосудов и т.д. (b) Общие последствия неправильного питания и т.д.	
Симптомы:	(a), связанные с известными изменениями тканей. (b) Без известных изменений в тканях.	

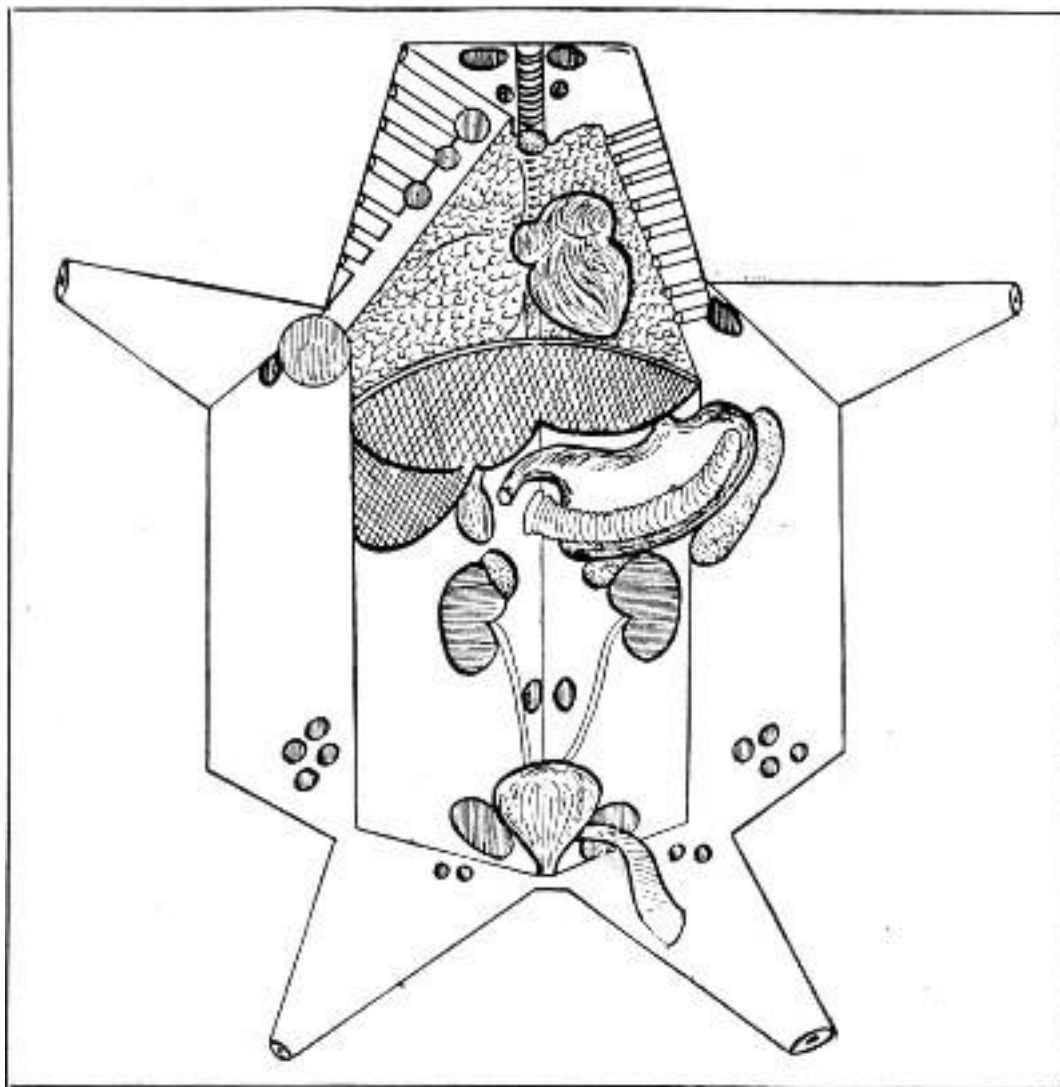


Рис. 201. Обратная

сторона посмертной карточки.

Постоянные заготовки—Музейные образцы.—

1. Ткани.—Видимые невооруженным глазом патологические ткани могут быть сохранены следующим методом:

1. Извлеките ткань или орган из трупа как можно скорее после смерти, соблюдая большую осторожность, чтобы избежать деформации или травм.
2. Поместите его в банку с широкой горловиной, достаточно большую, чтобы его было удобно держать, на ватный тампон и расположите в нужном положении (но если предполагается показать участок ткани или органа, пока не надрезайте его).
3. Залейте фиксирующим раствором Кайзерлинга и закупорьте банку; оставьте салфетки в этом растворе от сорока восьми часов до семи дней (в зависимости от размера) для закрепления. Сделайте все необходимые разрезы.

Модифицированный раствор Кайзерлинга готовят следующим образом:

Взвесить

Ацетат калия 30 грамм.

Нитрат калия 15 грамм.

и раствориться в

Дистиллированная вода 1000 °с

затем добавьте

Формалин 150°с

Фильтр.

Этот фиксирующий раствор можно использовать многократно, пока он остается прозрачным.

Даже когда он стал мутным, если простой фильтрации достаточно, чтобы сделать его прозрачным, фильтр можно использовать снова.

4. Опустите ткань в ванну с метилированным спиртом (95%) на тридцать минут - один час.

5. Перелейте в свежую спиртовую ванну и внимательно наблюдайте. Когда натуральные краски приобретут свои первоначальные оттенки, среднее время от трех до шести часов, достаньте салфетки из спиртовой ванны, вытрите спирт с поверхностей срезов мягкой тканью, затем нанесите на монтажный раствор.

Монтажное решение Jore (модифицированное) состоит из

Глицерин 500°с

Дистиллированная вода 750 °с

Формалин 2 °с

Не менее хорошим, но гораздо более дешевым является монтажное решение Frost:

Ацетат калия 160 грамм.

Фторид натрия 80 грамм.

Хлоралгидрат 80 грамм.

Тростниковый сахар (кубики Тейт) 3500 грамм.

Насыщенная тимоловая вода 8000 °с

6. После двадцатичетырехчасового пребывания в этом растворе или как только ткань впитается, переложите в музейную банку, залейте свежим монтажным раствором и запечатайте.

6а. Или переложите в музейную банку и залейте разжиженным желатином, к которому добавлен 1%. формалин. Накройте банку и дайте желатину застыть. Когда желатин застынет, плотно закройте крышку банки.

7. Чтобы запечатать музейную заготовку, сначала разогрейте стеклянную пластину, которая образует крышку. Удобнее всего это сделать, поместив очищенную и отполированную защитную пластину на кусок асбестовой плиты над приглушенным пламенем бунзена.

8. Нанесите ровный слой горячего цемента на фланец банки. Цемент готовится следующим образом:

Взвесьте и перемешайте в железном ковше

Гуттаперча (чистая) 4 части.

Асфальт 5 частей.

и расплавьте вместе на огне бунзена, помешивая железной палочкой, пока раствор не станет полным.

9. Переверните стеклянную пластину над банкой и плотно вдавите в цемент. Положите сверху кусок асбестовой плиты и положите на нее подходящий груз, пока цемент не остынет и полностью не схватится.

10. Обрежьте выступающие кусочки цемента старым ножом, зачистите стык между банкой и крышкой горячим гладким куском металла (*например*,, раскаленным утюгом).

11. Нарисуйте узкую полоску японского черного цвета для завершения, вокруг стыка, внахлест на накладную пластину.

II. Культивирование бактерий в пробирках.—При типичном внешнем виде они могут храниться, если не постоянно, то, по крайней мере, в течение многих лет, как музейные образцы, следующим способом:

1. Возьмите большую стеклянную банку 25 см. высокий 18 см. диаметр, с твердым основанием и широким фланцем, тщательно отшлифована, вокруг рта. Банка должна быть снабжена диском из листового стекла, отшлифованного с одной стороны, который будет служить крышкой.

2. Нанесите толстый слой смоляной мази (Б.П.) на фланец вокруг горлышка банки.

3. Застелите дно банки слоем ваты и пропитайте ее формалином.

4. Снимите ватную пробку с пробирок для культивирования и поместите их горлышком вверх внутрь банки. (Если в какой-либо из пробирок для культивирования присутствует конденсат, его следует удалить с помощью капиллярной пипетки перед помещением пробирок в формалиновую камеру.)

5. Установите стеклянный диск отшлифованной стороной вниз на горлышко банки и закрепите его, плотно вдавливая в мазь вращательными движениями.

6. По истечении недели извлеките пробирки из формалиновой камеры и высушите каждую снаружи.



Рис. 202.Трубки Буллоха.

7. Закройте открытые отверстия каждой трубки в пламени паяльной трубки и наклейте этикетку.

Если культуры предназначены для музейных целей, при их первой посадке удобнее использовать трубки Буллоха. Они немного длиннее обычных трубок и снабжены сужением примерно на 2 см ниже горловины (рис. 202) — особенность, которая упрощает герметизацию пламени паяльной трубки.

XX. ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ.

Студент, который добросовестно разработал методы и т.д., рассмотренные ранее, в состоянии проводить точные наблюдения и писать точные описания результатов таких наблюдений. Поэтому теперь ему доверено чистое культивирование различных патогенных бактерий, чтобы

он мог изучить историю жизни каждой из них и записать результаты своих собственных наблюдений, которые впоследствии будут исправлены или дополнены демонстратором. Таким образом, он становится независимым от описаний в учебниках, утверждений, которые в противном случае он был бы слишком склонен принимать на веру, не пытаясь лично проверить их точность.

В ходе этой работы внимание также должно быть направлено, при необходимости, на такие другие бактерии, патогенные или сапрофитные, которые связаны с конкретными наблюдаемыми организмами или настолько похожи на них, что могут стать возможными источниками ошибок, путем параллельного анализа — другими словами, различные бактерии следует изучать "группами". На следующих страницах принята группировка, используемая автором в начальных классах для студентов-медиков и стоматологов, а также для кандидатов на службу общественного здравоохранения, поскольку довольно длительный опыт полностью подтвердил ценность и полезность этой схемы, и с ее помощью получен фонд информации о сходстве и различиях, морфологических и культурных, большого количества бактерий. Тот факт, что некоторые бактерии представлены более чем в одной из этих групп, отнюдь не является недостатком, а является положительным преимуществом для учащегося, поскольку только с помощью повторения можно приобрести необходимое знакомство с культурными признаками важных бактерий. Изучение различных групп, конечно, будет варьироваться в деталях в зависимости от индивидуальных участников демонстрации и требований студента — общее направление, которого оно должно придерживаться, кратко указано только в связи с первой группой (стр. 410-411). Этот раздел должен быть тщательно проработан до того, как студент приступит к изучению бактериоскопического анализа.

Изучение патогенных бактерий принято начинать с Организмов, вызывающих нагноение. Это большая группа, поскольку все патогенные бактерии обладают способностью при определенных условиях инициировать чисто пиогенные процессы вместо своих специфических поражений или в дополнение к ним (*например*, *Bacillus tuberculosis*, *Streptococcus lanceolatus*, *Bacillus typhosus* и т.д.). Однако есть несколько организмов, которые обычно проявляют свою патогенность в образовании гноя. Обычно их объединяют под названием "гноеродные бактерии", в отличие от тех, которые лишь изредка выполняют гноеродную роль.

К этой группе относятся следующие организмы:

1. Стафилококк *pyogenes albus*.
2. Золотистый стафилококк *pyogenes*.
3. Цитрусовый стафилококк *pyogenes*.
4. *Streptococcus pyogenes longus*.
5. *Micrococcus tetragenus*.
6. *Bacillus pyocyaneus*.
7. *Bacillus pneumoniae*.

и в некоторых особых тканях

8. *Micrococcus gonorrhœæ*.
9. *Micrococcus intracellularis meningitidis* (Менингококк).

10. Катаральный микрококк.
11. Египетская палочка (бацилла Коха-Уикса).

Группа может быть с преимуществом разделена, как указано на следующих страницах:

I. *Гнойные кокки.*

Стафилококк *pyogenes albus*.

Золотистый стафилококк.

Цитрусовый стафилококк.

для контраста с

Micrococcus candidans.

Micrococcus agilis.

1. Подготовьте подборки из каждого:

Бульон, }

Прожилки агара, }

Сыворотка крови, }

Лакмусовая бумажка. } и инкубировать при 37°C.

Полоска агара, }

Желатиновая полоска, }

Картофель. } и инкубировать при 20°C.

Сравните вид культур невооруженным глазом изо дня в день. Обратите внимание, что *M. agilis* отказывается расти при 37 ° C.

2. Приготовьте препараты в виде капель из бульона и агара после двадцатичетырехчасовой инкубации. Исследуйте под микроскопом и сравните. Обратите внимание на двигательную активность *M. agilis* и броуновское движение оставшихся микрококков.

3. Приготовьте покровные пленки из агаровых культур после двадцатичетырехчасовой инкубации. Окрашивайте жгутики модифицированным методом Питфилда. Примечание. *M. agilis* - единственный микрококк, имеющий жгутики.

4. Сделайте микроскопические препараты каждого из всех различных сред после инкубации в течение двадцати четырех и сорока восьми часов и трех дней. Окрашивают карболовым метиленовым синим, карболовым фуксином и методом Грамма. Исследуйте пленки под микроскопом и сравните. Обратите внимание на грамотрицательный характер определенных отдельных кокков в каждой пленке, полученной в результате трехдневного роста — такие кокки мертвы.

5. Окрашивают предоставленный участок ткани почки (показывающий образование абсцесса золотистым стафилококком) по методу Грама и окрашивают косином.

6. Окрашивают пленочный препарат гноя из абсцесса (содержащий золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus*) карболовым метиленовым синим, а также методом Грамма, окрашивают косином.

7. Инокулируйте[15] белой мыши подкожно тремя порциями сороковивосьмичасового культивирования в агаре золотистого стафилококка, эмульгированного 0,2 стакана стерильного бульона.

Внимательно наблюдайте при жизни, а когда наступит смерть, проведите тщательное посмертное обследование.

II. *Пуогенные кокки.*

Гонококковый микоз.

Micrococcus intracellularis meningitidis (менингококк).

Катаральный микрококк.

Micrococcus tetragnus.

Micrococcus paratetragnus.

III. *Пуогенные кокки.*

Streptococcus pyogenes longus.

Стрептококк при мастите крупного рогатого скота.

Streptococcus lanceolatus (Диплококк пневмонии или пневмококк).

для контраста с

Streptococcus brevis.

Streptococcus lebensis.

IV. *Гноеродные бациллы.*

Bacillus pneumoniae (Фридлендер).

Bacillus rhinoscleromatis.

Bacillus lactis aerogenes.

V. *Гноеродные бациллы.*

Гнойная палочка.

для контраста с

Bacillus fluorescens liquefaciens.

Bacillus fluorescens non-liquifaciens.

VI. *Группа пневмоний.*

Ланцетный стрептококк (пневмококк).

Пневмококковая палочка (Friedlaender).

Streptococcus pyogenes longus.

VII. Группа дифтероидов.

Бацилла дифтерийная (Клебса-Леффлера).

Бацилла Хоффмана.

Бацилла ксероза.

Бацилла септус.

VIII. Коли-тифозная группа.

В. брюшной тиф (*B. typhosus*).

B. coli communis.

B. enteritidis (Gaertner).

для контраста с

B. aquatilis sulcatus.

IX. Группа Эшериха.

B. coli communis (кишечная палочка).

B. coli communior.

B. lactis aerogenes.

B. cloacae.

X. группа Гертнера.

Bacillus enteritidis (Gaertner).

B. paratyphosus A.

B. paratyphosus B.

Bacillus cholerae suum (свиная холера).

В. пситтакоз.

XI. Группа Эберта.

B. typhosus (Эберт).

B. dysenteriae (Сига).

B. dysenteriae (Флекснер).

B. faecalis alcaligines.

XII. Группа спирилл.

Холерный вибрион.

Вибрион мечникова.

для контраста с

Vibrio proteus (Finkler и Prior).
Spirillum rubrum.
Spirillum rugula.

XIII. Группа сибирской язвы.

Антрацитовая палочка.
для контраста с
Bacillus subtilis.
Bacillus mycoides.
Bacillus mesentericus fuscus.

XIV. Быстрая кислотная группа.

Бацилла туберкулеза (человека).
" " (крупного рогатого скота).
" " (птичий).
" " (рыбный).
для контраста с
Bacillus phlei (палочкой тимофеевки).
Масляная палочка Рабиновича.

XV. Группа распространения чумы.

Чумная палочка.
В. септический геморрагический.
В. suipestifer.

XVI. Группа гриппа.

В. influenzæ.
Бацилла египетская (Кох-Уикс).
Коклюшная палочка.

XVII. Разное.

Бацилла проказы.
Бацилла моллей.
Micrococcus melitensis.

XVIII. Группа Streptothrix.

Streptothrix actinomycotica.
Streptothrix maduræ.

для контраста с
Cladothrix nivea.

XIX. Группа по столбняку.

Бацилла столбняка.
Bacillus oedematis maligni.
Bacillus chauvei (симптоматическая сибирская язва).

XX. Группа *enteritidis sporogenes*.

Bacillus enteritidis sporogenes.
B. botulinus.
B. butyricus.
B. cadaveris.

СНОСКИ:

[15] Смотрите примечание о лицензии на вивисекцию, страница 334.

XXI. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ.

Каждый бактериологический или бактериоскопический анализ воздуха, почвы, сточных вод, различных продуктов питания и т.д. включает, как правило, два отдельных исследования, дающих результаты весьма неодинаковой ценности:

1. Количественный.
2. Качественный.

Первый метод является чисто количественным и как таковой имеет второстепенное значение, поскольку он направлен просто на подсчет (приблизительно) общего количества бактерий, присутствующих в любой данной единице объема, независимо от природы и характеров отдельных организмов.

Второй и более важный метод носит как качественный, так и количественный характер, поскольку он направлен на точную идентификацию таких патогенных бактерий, которые могут присутствовать, в то время как, между прочим, предлагаемые методы рассчитаны так, чтобы с достаточной степенью точности указывать численную частоту таких бактерий в исследуемом образце.

Общие принципы, лежащие в основе бактериологических анализов воды, сточных вод, воздуха и пыли, почвы, молока, мороженого, мяса и других консервированных продуктов, иллюстрируемые методами, используемыми автором, указаны на следующих страницах вместе

с методами тестирования фильтров и химических бактерицидов; и будет установлено, что изложенная там методика может быть расширена и адаптирована к любым обстоятельствам, с которыми может столкнуться студент.

Средства контроля.— Нельзя слишком настаивать на необходимости наличия адекватных средств контроля во всех экспериментальных работах. Каждая партия разливаемых чашек должна включать по крайней мере одну из предположительно "стерильных" сред; культуры в чашках или пробирках должны быть приготовлены из различных разбавляющих жидкостей; каждая пробирка с инокулированной углеводной средой должна поступать в инкубатор вместе с аналогичной, но не инокулированной пробиркой и так далее.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ.

Бактерии, присутствующие в воде, могут включать не только разновидности, которые имеют нормальную среду обитания в воде и, следовательно, будут развиваться при 20 ° С, но также, если вода была загрязнена экскрементами, разновидности, которые были получены из организма животного или являются патогенными для него и которые будут хорошо развиваться только при температуре 37 ° С. Чтобы продемонстрировать наличие каждого из этих классов, необходимо будет инкубировать различные культуры при каждой из этих температур.

Кроме того, в пробе воды могут содержаться плесневые грибки, дрожжи или торуле, и их развитие лучше всего обеспечить, поместив в желатин из сусла и выдержав при 20°C.

1. Количественный.—

Сбор образца.—Наиболее подходящими сосудами для взятия пробы воды являются небольшие стеклянные бутылки емкостью 60 куб. см с узкими горлышками и выступающими стеклянными пробками (для предотвращения загрязнения горлышек бутылок попадающей пылью). Их необходимо тщательно простерилизовать в стерилизаторе с горячим воздухом (см. стр. 31).

(а) Если образец берется из **крана** или **трубы**, включите воду и дайте ей стечь в течение нескольких минут. Выньте пробку из бутылки и держите ее в руке, пока вода не стечет в бутылку и не наполнит ее на три части. Установите пробку на место и завяжите ее, но *не герметизируйте*.

(b) Если образец берется из **ручья**, **tank**, или **емкости**, закрепите кусок прочной проволоки вокруг горлышка бутылки, снимите пробку и держите ее в руке. Затем, используя проволоку в качестве ручки, опустите бутылку в воду горлышком вниз, пока она не окажется значительно ниже поверхности; затем переверните ее, дайте наполниться и извлеките из воды. Налейте несколько кубических сантиметров воды из бутылки, закройте ее пробкой и плотно завяжите.

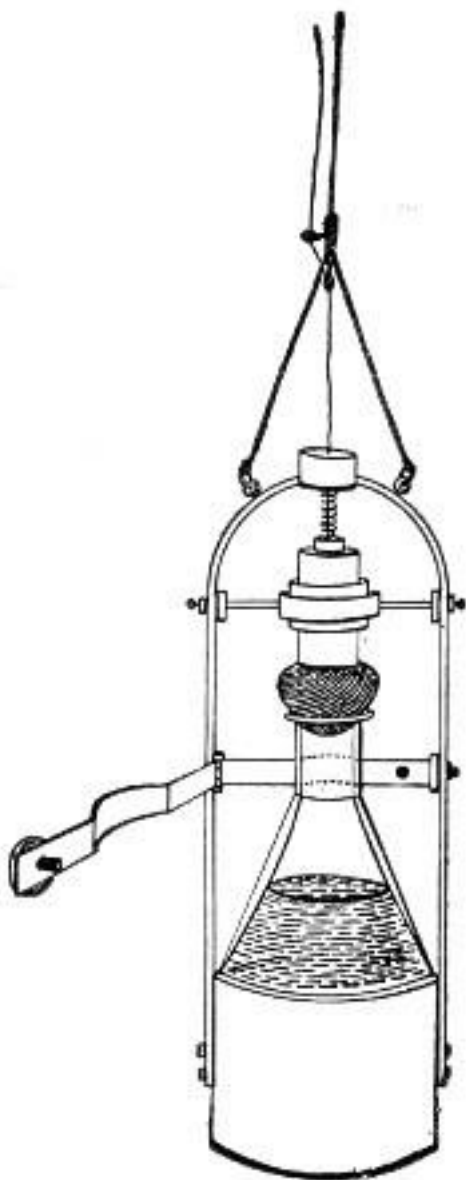


Рис. 203. Бутылка Эсмарха для сбора проб воды.

(с) Если проба берется из **озера, реки** или **моря**; или когда требуется сравнить пробы, взятые на разной глубине, используется прибор, разработанный В. Эсмархом (рис. 203). При этом стерилизованная бутылка помещается в утяжеленный металлический каркас, который можно опускать с помощью градуированной лески до тех пор, пока не будет достигнута необходимая глубина. В этот момент бутылка открывается с помощью тонкого проволочного шнура, прикрепленного к пробке; когда бутылка наполняется (судя по тому, что пузырьки воздуха перестают подниматься), натяжение шнура отпускается, и спиральная пружина над пробкой снова вдавливая ее в горлышко бутылки. Когда прибор вынимают из воды, маленькие бутылочки наполняются из него и упаковываются в ящик для льда, упомянутый ниже.

Недорогую замену бутылке Esmarch's можно изготовить в лаборатории следующим образом:

Выберите стеклянную бутылку с широкой горловиной и пробкой емкостью около 500 мл (около 20 см. высотой и 8 см в диаметре).

Снимите стеклянную пробку и вставьте на ее место резиновую пробку с двумя отверстиями.

Через одно отверстие проденьте кусок стеклянной трубки длиной около 5 см, а через другое - кусок длиной 22 см, достигающий почти до дна бутылки, при этом каждая трубка выступает примерно на 2,5 см над резиновой пробкой. Заткните открытые концы тюбиков ватой. Закрепите пробку на месте тонкой медной проволокой.

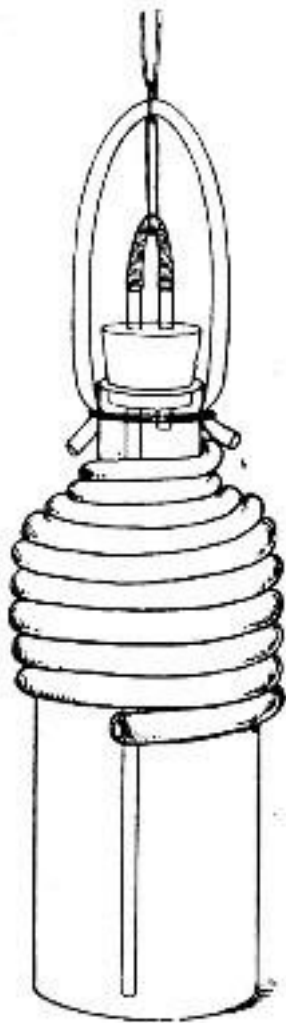


Рис. 204. Глубоководный пробоотборник Thresh.

Стерилизуйте флакон в автоклаве. Снимите ватные пробки и соедините выступающие трубки отрезком неплотно прилегающей прочной резиновой трубки длиной около 5 см, предварительно стерилизованной кипячением.

Возьмите кусок прочного резинового шнура длиной около 33 см и диаметром 10 мм (такой используется для изготовления дверных пружин), наденьте на него стальное разрезное кольцо и плотно закрепите свободные концы на горлышке бутылки с помощью шнура или кетгута.

Прикрепите шнур, используемый для опускания бутылки в воду, к разъемному кольцу на резиновой подвеске. Лучшим материалом для этой цели является электрический провод с хлопчатобумажной изоляцией, завязанный узлом на каждом метре.

Соедините разъемное кольцо также с коротким отрезком резиновой трубки, соединяющей две стеклянные трубки, с помощью куска кетгута (или тонкой медной проволоки) такой длины, чтобы при подвешивании бутылки резиновая трубка не натягивалась, но которая, однако, легко снималась при резком натяжении подвесного шнура.

Теперь обмотайте тяжелую свинцовую трубку диаметром около 1 см вокруг верхней части бутылки, начиная с горлышка чуть выше плеча. Это обеспечивает опускание бутылки в вертикальное положение (рис. 204).

Устанавливаемое устройство опускается на необходимую глубину, затем делается резкий рывок за подвесной шнур, который отсоединяет резиновую трубку и таким образом открывает две стеклянные трубки. Вода поступает через более длинную трубку, а воздух выводится через более короткую трубку. Можно видеть или слышать пузырьки воздуха, поднимающиеся над водой, пока бутылка не будет почти заполнена, при этом в горлышке бутылки остается небольшой объем сжатого воздуха.

Когда устройство поднимается, воздух, заключенный таким образом, расширяется и предотвращает попадание большего количества воды с более близкой поверхности.

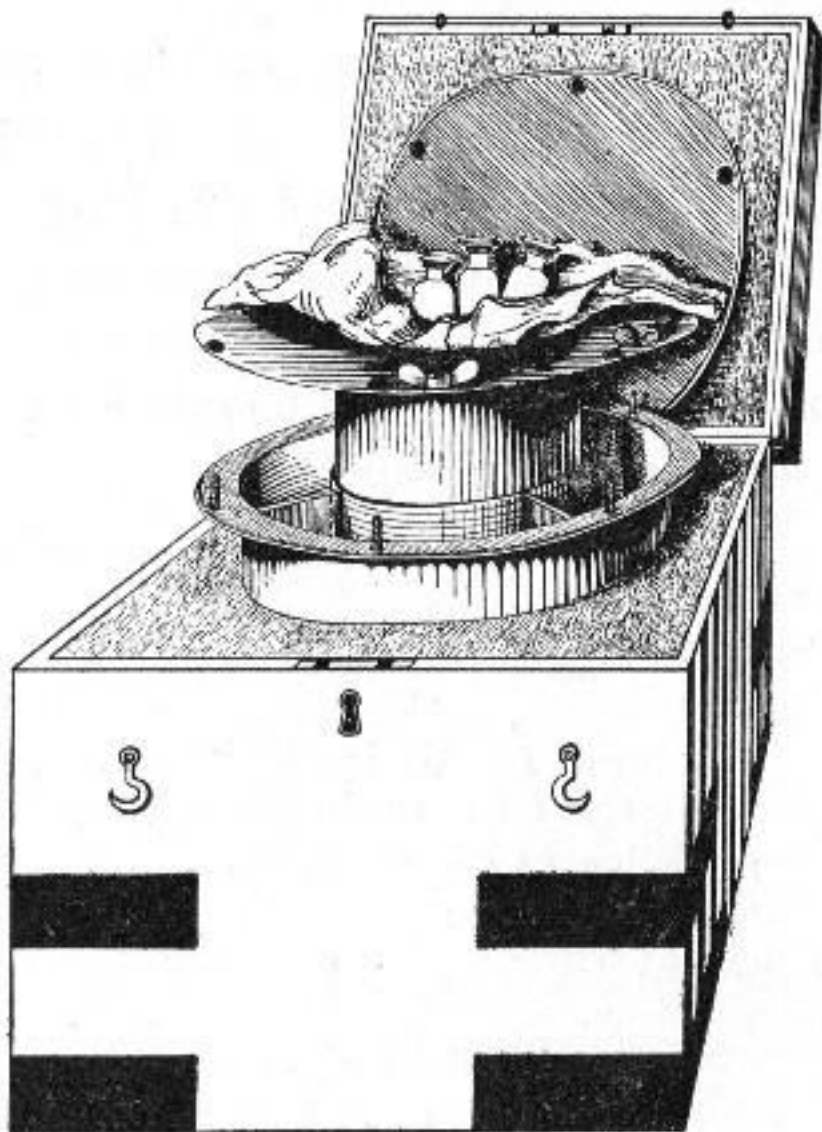


Рис. 205.—Контейнер со льдом

для передачи проб воды и т.д.

Транспортировка образца.—Если исследование образца не может быть начато немедленно, необходимо принять меры для предотвращения размножения бактерий, содержащихся в воде, в течение промежутка времени, занимаемого транспортировкой от места сбора до лаборатории. Для этого необходим ящик со льдом, подобный показанному на рис. 205. Он состоит из металлического цилиндра с двойными стенками, в который вставляется цилиндрическая камера достаточной вместимости, чтобы вместить четыре бутылки по 60 с.с.; она, в свою очередь, закрыта металлическим диском - три части скреплены между собой винтами с накатанной головкой через выступающие фланцы. Перед использованием поместите бутылки, завернутые в вату, в центральную камеру, пространство между стенками засыпьте толченым льдом, надежно закройте металлическую коробку, завинтив гайки, и поместите ее в деревянный футляр, обшитый войлоком. (Было показано, что, хотя бактерии выживают при температуре тающего льда, практически ни одна из них не будет размножаться при этой температуре.)

По прибытии в лабораторию метод исследования заключается в добавлении измеренных количеств пробы воды в несколько пробирок с питательной средой, предварительно разжиженной при нагревании, заливке образцов для культивирования на планшеты из каждой из этих пробирок, инкубировании при подходящей температуре и, наконец, подсчете колоний, которые появляются на планшетах.

Требуемое оборудование:

Подставка для выравнивания тарелок.

Ящик со стерильными тарелками.

Коробка стерильных пипеток, 1 куб.см (в десятых долях кубического сантиметра).

Коробка стерильных пипеток, 10 мл (в десятых долях кубического сантиметра).

Упаковка стерильных капсул, вместимостью 25 куб.см.

Тюбики с питательным желатином.

Тюбики с питательным агаром.

Тюбики с желатином для сусла.

Одна колба со стерильной дистиллированной водой на 250°с.

Высокий цилиндр, содержащий 2%. раствор лизола.

Горелка Бунзена.

Смазочный карандаш.

Водяная баня регулируется на 42 ° С.

Способ.—

1. Установите платформу для выравнивания плит так, чтобы ее водяной отсек был заполнен водой при температуре 45°С.
2. Пронумеруйте последовательно пробирки с агаром от 1 до 6; пробирки с желатином от 1 до 6 и пробирки для сусла - 1, 2 и 3. Раскройте пробки и убедитесь, что они не прилипли к горловинам пробирок.
3. Поместите трубочки с агаром в кипящую воду до тех пор, пока среда не расплавится, затем перенесите их на водяную баню с регулируемой температурой 42 ° С. Желатиновые трубочки с питательными веществами и желатином для сусла разжижите, погрузив их в ту же водяную баню.
4. Достаньте бутылку с образцом воды из холодильника, встряхнув, равномерно распределите бактериальное содержимое по воде, перережьте бечевку, удерживающую пробку, и ослабьте пробку, но не вынимайте ее.

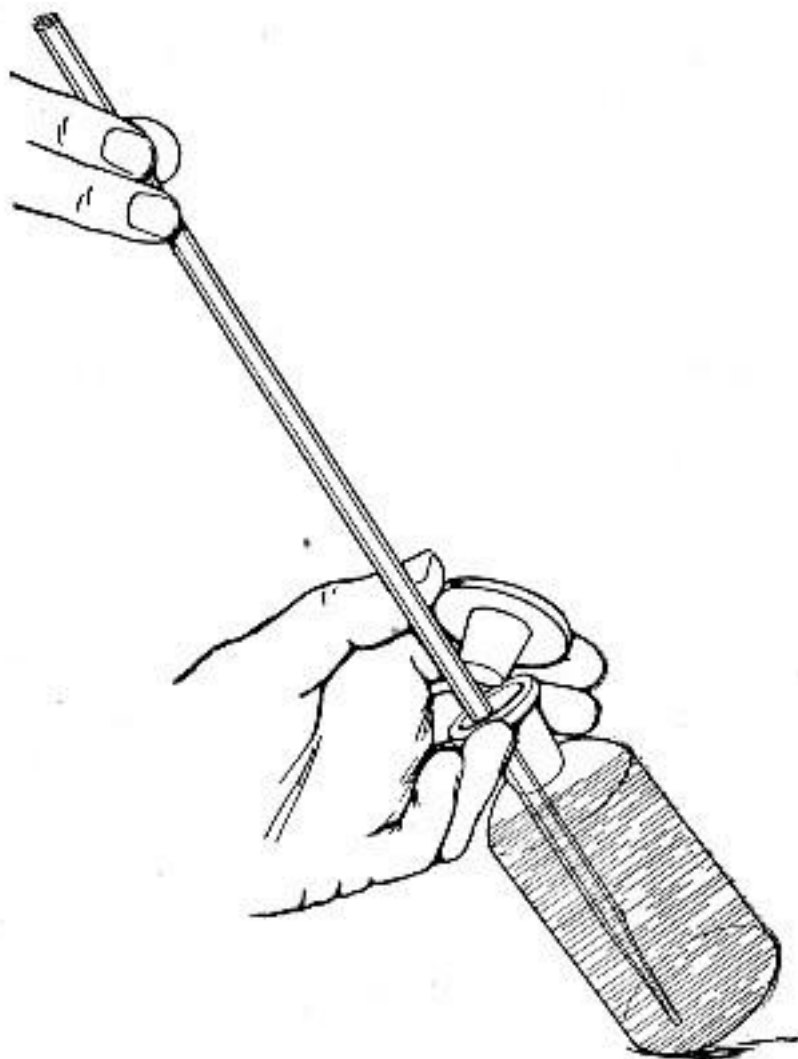


Рис. 206. Забор воды из

бутылки для отбора проб воды.

5. Извлеките одну из пипеток объемом 1 ст.л. из футляра, держа ее за плоскую часть трубки. Дважды пропустите градуированную часть через пламя Бунзена. Наклоните бутылку с образцом воды на верстаке, держа горлышко между средним и безымянным пальцами левой руки; возьмитесь за головку пробки между указательным и большим пальцами и извлеките ее из бутылки.

6. Вставьте пипетку в горлышко флакона, держа ее острие значительно ниже поверхности воды (рис. 206). Наберите в пипетку чуть больше 1 ст.л. воды и дайте пипетке опорожниться; это увлажняет внутреннюю поверхность пипетки и делает возможным точное измерение. Теперь наберите в пипетку ровно 1 ст.л. воды. Извлеките пипетку из флакона, закройте пробкой и поставьте флакон вертикально.

7. Возьмите первую пробирку с расплавленным агаром в левую руку, выньте ватную пробку и добавьте к ее содержимому 0,5 стакана образца воды из пипетки; снова вставьте пробирку и поставьте ее на водяную баню. Аналогичным образом добавьте 0,3 стакана воды к содержимому второго тьюбика и 0,2 стакана воды к содержимому третьего.

8. Аналогичным образом добавьте 1 ч.л. образца к содержимому четвертой пробирки.

9. Аналогичным образом добавьте 0,5 ст.л. и 0,1 ст.л. соответственно к содержимому пятой и шестой пробирок.
10. Опустите пипетку в цилиндр с раствором лизола.
11. Смешайте пробу воды со средой в каждой пробирке способом, описанным в разделе "Культивирование на пластинах"; налейте на пластину из каждой пробирки. На этикетке каждой пластины нанесите (а) отличительный номер образца, (b) количество содержащейся в ней пробы воды и (с) дату.
12. Вылейте содержимое тюрбика с разжиженным агаром — не инокулированным — в чашку Петри в качестве контроля для демонстрации стерильности используемой порции агара.
13. Дайте чашкам застыть и инкубируйте при 37°C.
14. Опорожните водяную камеру выравнивающего устройства и наполните ее водой со льдом.
15. С помощью стерильной 10-градусной пипетки налейте 9,9-градусную стерильную дистиллированную воду в стерильную стеклянную капсулу.
16. Добавьте 0,1°с образца воды к 9,9 °с стерильной воды в капсуле. Это даст разбавление 1 к 100.
17. Приготовьте шесть тюрбиков с питательным желатином следующим образом: в первый тюрбик добавьте 0,5 стакана пробы воды прямо из бутылки; во второй - 0,3 стакана; а в третий - 0,2 стакана; и налейте по тарелке из каждого тюрбика. В четвертую пробирку добавьте 0,5 стакана разбавленной пробы воды из капсулы; в пятую - 0,3 стакана; и в шестую - 0,2 стакана; и налейте по тарелке из каждой.
18. На этикетке каждой пластины указано количество содержащейся на ней пробы воды, то есть 0,5 °с, 0,3 °с, 0,2 °с, 0,005 °с, 0,003 °с и 0,002 °с
19. Налейте в контрольную (неулированную) форму желатин.
20. Дайте чашкам застыть и инкубируйте при 20°C.
21. В первый тюрбик со сжиженным желатином для сусла добавьте 0,5 стакана воды; во второй - 0,3 стакана; и в третий - 0,2 стакана
22. Наклейте этикетки на чашки, дайте им застыть и инкубируйте при 20°C.
23. Подсчитайте и запишите количество колоний, которые развились на агаре при 37° С после сорока восьми часов инкубации.
24. Обратите внимание на количество колоний, присутствующих на каждой пластинке с желатином для желатина и сусла после сорока восьми часов инкубации.
25. Поставьте тарелки с желатином и суслом на место в инкубаторе; повторите наблюдение через три, четыре и пять дней.
26. Рассчитайте и запишите количество микроорганизмов, присутствующих на кубический сантиметр исходной воды, исходя из среднего значения шести желатиновых пластинок, не

позднее, чем через семь дней — наличие бактерий, разжижающих жидкость, может сделать расчет необходимым в более ранний срок, отсюда важность ежедневных наблюдений.

Метод подсчета.—Наиболее точный метод подсчета колоний на каждой из пластинок - с помощью счетного диска Джеффри или Пейкса. Каждый из этих дисков состоит из листа бумаги, на котором напечатан ровный черный диск, разделенный concentрическими окружностями и радиусами, нанесенными белым шрифтом. В счетчике Джеффри (рис. 207) каждое деление имеет площадь в 1 квадратный сантиметр; в счетчике Пейкса (рис. 208) радиусы делят круг на шестнадцать равных секторов, и подсчет облегчается concentрическими окружностями, равноудаленными от центра.

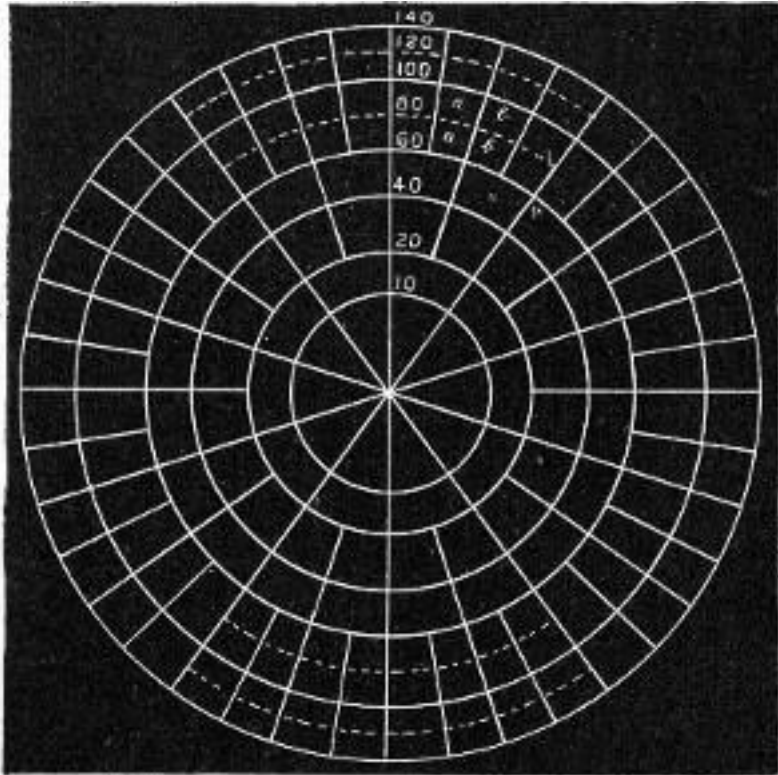


Рис. 207. Диск Джеффри, уменьшенный.

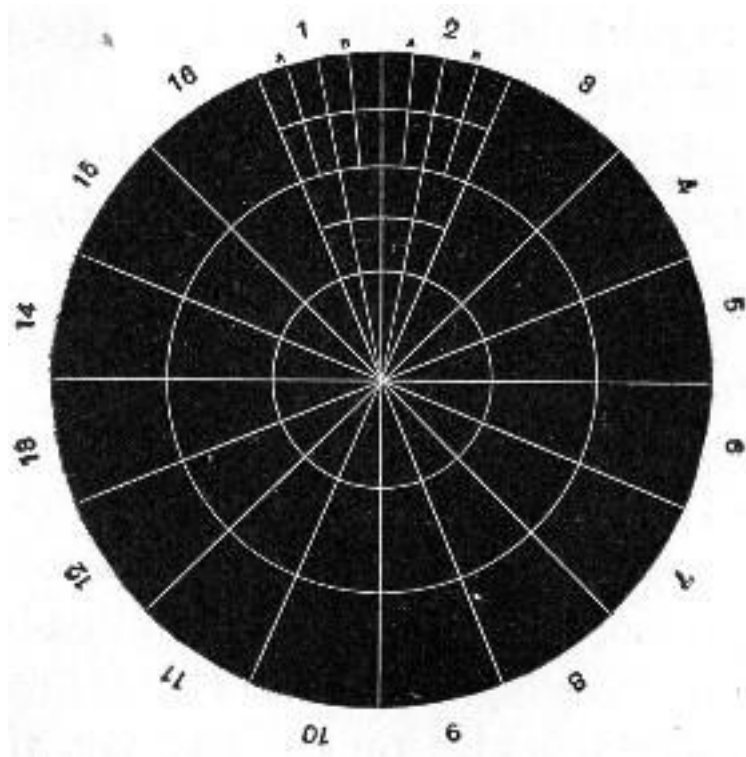


Рис. 208. Диск для выпекания,

уменьшенный.

(а) При окончательном подсчете каждой пластины поместите пластину поверх счетного диска и отцентрируйте ее, по возможности, так, чтобы ее периферия совпадала с той или иной из концентрических окружностей.

(б) Снимите крышку с планшета и с помощью ручной линзы поочередно подсчитайте колонии, появляющиеся в каждом из секторов. Запишите номер, присутствующий в каждом из них.

(с) Если присутствующих колоний меньше 500, следует пересчитать всю чашку. Если, однако, они превышают это число, пересчитайте половину или четверть пластины или сосчитайте сектор здесь и там и по этим цифрам оцените количество колоний, присутствующих на всей пластине. На практике обнаружится, что диск Пейкса больше подходит для первого класса пластин, а диск Джеффри - для второго. Однако следует помнить, что до тех пор, пока пластины не будут тщательно выровнены и среда не будет равномерно распределена по всей поверхности, бесполезно пытаться выполнять усреднение с небольших участков — поскольку там, где среда толстая, будут развиваться все бактерии, а там, где слой тонкий, только несколько бактерий найдут достаточно места для образования видимых колоний.

Следует отметить, что количество воды, выбранное для добавления в каждый набор пробирок с питательными средами, было тщательно подобрано для получения приемлемых результатов даже при работе с сильно отличающимися образцами. Планшеты, приготовленные в агаре с температурой 0,1 °с и в желатине с температурой 0,02 °с, можно подсчитать даже при наличии большого количества бактерий в образце; тогда как, если микроорганизмов относительно мало, планшеты с агаром 4 и желатиновые планшеты 1 дадут наиболее надежные результаты подсчета. Опять же, количество чашек в определенной степени контролирует друг друга;

например, вторая и третья чашки каждой серии желатина должны вместе содержать столько же колоний, сколько и первая, а вторая должна содержать примерно вдвое больше, чем третья, и так далее.

2. Качественная экспертиза.—

Сбор образца.—Проба воды, необходимая для рутинного исследования, которую будет удобно рассмотреть в первую очередь, составляет около 110 °с. Ее отбирают ранее описанным способом (*видео*, стр. 416); используются аналогичные бутылки, и если наполнить четыре, общее содержимое, составляющее около 240 °с, обеспечит достаточный материал как для качественного, так и для количественного исследования. Если исследование не должно быть начато немедленно, необходимо использовать контейнер со льдом, в противном случае водные бактерии и другие сапрофиты, вероятно, будут размножаться за счет микробов, указывающих на загрязнение, и, таким образом, увеличат трудности исследования.

При рутинном обследовании систем водоснабжения принято ограничивать качественное обследование поиском

A. *B. coli* и ее ближайшие союзники.

B. Стрептококки,

организмы, о которых часто говорят как о микробах-индикаторах, поскольку их присутствие считается свидетельством загрязнения воды материалом, полученным из пищеварительного тракта млекопитающих, и, таким образом, представляет собой сигнал опасности.

C. Некоторые наблюдатели по-прежнему придают большое значение присутствию *B. enteritidis sporogenes*, но поскольку поиск этой бактерии (относительно редкой в воде) требует сбора довольно большого количества воды, ее обычно не включают в рутинное обследование.

В случае проб воды, исследованных в ходе эпидемии, новых запасов и неизвестных источников, поиск распространяется на других представителей группы кишечных палочек и брюшного тифа; и иногда может потребоваться расследование вопроса о присутствии или отсутствии холерного вибриона или (реже) таких бактерий, как *B. anthracis* или *B. tetani*.

Когда в воде присутствуют патогенные бактерии или бактерии экскрементов, их количество относительно невелико из-за разбавления, которому они подверглись, и обычно в начале исследования используется один из следующих методов:

A. *Обогащение*, при котором безвредные непатогенные бактерии могут быть уничтожены или их рост подавлен, в то время как рост паразитических бактерий поощряется.

Это достигается путем организации окружающей среды (*т.е.* Среда, температуры инкубации и атмосферы) таким образом, чтобы способствовать росту патогенных организмов за счет безвредных сапрофитов.

B. *Концентрация*, при которой все бактерии, присутствующие в образце воды, патогенные или иные, сосредоточены в небольшом объеме жидкости.

Обычно это достигается путем фильтрации пробы воды через фарфоровую фильтрующую свечу и последующей эмульсии остатков бактерий, оставшихся на стенках свечи, небольшим отмеренным количеством стерильного бульона.

А. Способ обогащения.

(Имея дело с демонстрацией бактерий кишечного происхождения.)

Требуемое оборудование (Предварительный этап):

Инкубатор, работающий при температуре 42°C.

Ящик со стерильными пипетками, градуированный на 1 °C.

Коробка стерильных пипеток с градуировкой 10°с.

Коробка стерильных пипеток с градуировкой 25 °с.

Пробирки с бульоном из желчных солей (*вид* стр. 180).

Колба с бульоном из желчных солей двойной крепости (*видео*, страница 199).

Пробирки из лакмусовой бумажки.

Стерильные флаконы вместимостью 250 мл.

Трубки Бюхнера.

Таблоиды пирогаллиновая кислота.

Таблоиды гидрат натрия.

Горелка Бунзена.

Смазочный карандаш.

(Более поздний этап):

Инкубатор работает при температуре 37°C.

Поверхность чашек покрыта нутрозным агаром (см. стр. 232).

Алюминиевый разбрасыватель.

Пробирки для различных сред, в том числе углеводных.

Агглютинирующие сыворотки и т.д.

Способ.—

1. Пронумеруйте набор бульонов с желчной солью, пробирки 1-5 и дублирующий набор 1а-5а.

2. Пронумеруйте одну колбу 7, а другую 8.

3. В пробирки № 1 и 1а добавьте 0,1% пробы воды.

В пробирки № 2 и 2а добавьте по 1 пробе воды.

В пробирки № 3 и 3а добавьте 2-градусную пробу воды.

В пробирки № 4 и 4а добавьте 5-градусную пробу воды.

В пробирки № 5 и 5а добавьте 10-градусную пробу воды.

4. Поместите все пробирки в пробирки Бюхнера и инкубируйте анаэробно при 42 °C.

Примечание.—Среда с желчными солями особенно подходит для культивирования бактерий кишечного происхождения и в то же время подавляет рост бактерий, полученных из других источников.

Анаэробные условия также способствуют размножению кишечных бактерий, а также их ферментативной активности. Температура 42° С. уничтожает обычные водные бактерии и подавляет рост многих обычных мезофильных бактерий.

5. Перелейте 25 мл желчно-солевого бульона двойной крепости в колбу 6 и 50 мл желчно-солевого бульона двойной крепости в колбу 7.

6. Наберите пипеткой 25-градусную пробу воды в колбу 6 и 50-градусную пробу воды в колбу 7.

7. Аэробно инкубируйте две колбы при температуре 42°С.

8. После двадцатичетырехчасовой инкубации обратите внимание на каждую культуру:

а. Наличие или отсутствие видимого роста.

б. Реакция среды, о чем свидетельствует изменение цвета лакмусовой бумажки, если таковое имело место.

с. Наличие или отсутствие газообразования, на что указывает пена на поверхности среды и скопление газа во внутренней "газовой" трубке.

9. Замените те пробирки, в которых нет признаков роста в инкубаторе. Проведите исследование еще через двадцать четыре часа (всего сорок восемь часов инкубации) с привязкой к тем же точкам.

10. Удалите пробирки для культивирования, в которых наблюдается видимый рост, из пробирок Бюхнера, независимо от того, присутствуют ли выделения кислоты и газообразование или нет.

11. Осмотрите все пробирки, в которых обнаружен рост, с помощью препаратов в виде подвесных капель. Обратите внимание на те, которые указывают на наличие цепочек кокков.

12. Подготовьте образцы для культивирования на поверхностных пластинах на нутрозном агаре из каждой пробирки, на которых макроскопически или микроскопически виден рост, и инкубируйте в течение двадцати четырех часов аэробно при 37 ° С.

13. Исследуйте наросы на пластинках либо невооруженным глазом, либо с помощью маленькой ручной линзы. Практика облегчит распознавание колоний группы coli, группы брюшного тифа и группы паратифов, а также колоний, вызванных ростом стрептококков. Начиная с этого этапа, расследование ведется по двум расходящимся направлениям: первое связано с идентификацией бацилл—брюшнотифозных палочек, второе — с идентификацией кокков.

A. B. Coli и ее союзники.

14. Отберите колонии кишечной палочки или брюшного тифа; сделайте штриховые или размазанные субкультуры на питательном агаре; инкубируйте аэробно в течение двадцати четырех часов при 37 ° С.

15. Тщательно изучите рост в каждой пробирке как макроскопически, так и микроскопически. Если рост нечистый, пересыпьте на нутрозный агар, оборвите колонии и снова подкультивируйте. Когда новообразование в пробирке станет чистым, добавьте 5-градусный стерильный физиологический раствор или стерильный бульон и эмульгируйте им всю поверхность новообразования.

16. Используйте эмульсию для приготовления серии субкультур на перечисленных ниже средах, используя обычную петлю для получения субкультур на твердых средах, но добавляя одну десятую кубического сантиметра эмульсии в каждую из жидких сред с помощью стерильной пипетки.

Желатиновая прожилка.

Агаровая прожилка.

Картофельная.

Питательный бульон.

Лакмусовое молоко.

Раствор пептона декстрозы.

Раствор левулозного пептона.

Раствор галактозного пептона.

Раствор мальтозного пептона.

Раствор лактозного пептона.

Раствор сахарозного пептона.

Раствор рафинозного пептона.

Раствор дульцитного пептона.

Раствор пептона маннита.

Раствор пептона глицерина.

Раствор пептона инулина.

Раствор декстринового пептона.

17. Дифференцируйте бациллы после выделения с помощью их культурных реакций и биологических признаков на представителей:

I. Группа Эшериха.

B. coli communis.

B. coli communior.

B. lactis aerogenes.

B. cloacae.

II. Группа Гертнера.

Bacillus enteritidis (Гертнера).

B. paratyphosus A.

B. paratyphosus B.

Холерная палочка.

III. Группа Эберта.

B. typhosus.

B. dysenteriae (Шига).

B. dysenteriae (Флекснер).

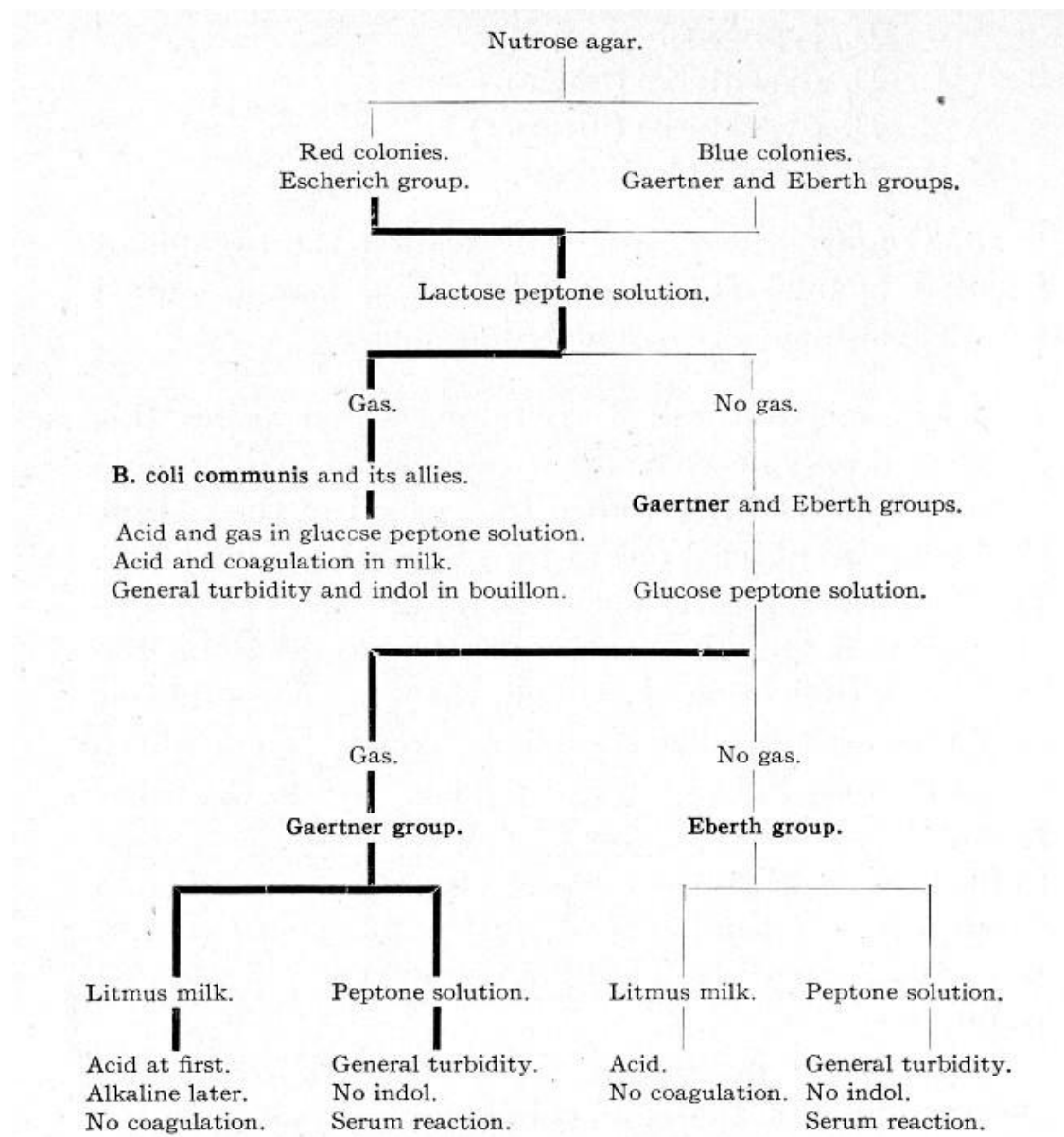
B. faecalis alcaligines.

18. Подтвердите эти результаты, протестировав выделенные организмы на специфическую агглютинирующую сыворотку, полученную от экспериментально привитых животных.

Если при использовании этого метода получен положительный результат, требуется лишь простой расчет для определения наименьшего количества (до 0,1 у.е.) образца, содержащего хотя бы один из показательных микробов. Например, если рост происходит во всех пробирках от 4 до 10, и впоследствии доказывається, что этот рост обусловлен размножением *B. coli*, то из этого следует, что по крайней мере одна кишечная палочка присутствует на каждые 10°с в образце воды, но не на каждые 5°С. Если, с другой стороны, присутствие *B. coli* может быть доказано только в колбе №7, то среднее количество кишечных палочек, присутствующих в образце, составляет по крайней мере одну на каждые 50°с (*m.e.*, двадцать на литр), но не по одному на каждые 25 °с и так далее.

Общая схема метода идентификации представителей группы кишечных палочек и брюшного тифа представлена в виде аналитической схемы, в то время как полные дифференциальные данные представлены в табличной форме.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ СХЕМА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ГРУПП СОЛІ И БРЮШНОГО ТИФА.



B. Стрептококки.

19. Отделите колонии стрептококка и субкультивируйте на питательном агаре в точности, как указано на этапах 14, 15 и 16.

20. Дифференцируйте выделенные стрептококки на представителей сапрофитной группы короткоцепочечных кокков или представителей паразитарной (патогенной) группы длинноцепочечных кокков с помощью их культуральных признаков и регистрируйте их числовую частоту способом, указанным для представителей группы кишечной палочки и брюшного тифа.

ТАБЛИЦА РАЗЛИЧИЙ ГРУППЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ И БРЮШНОГО ТИФА

Подви жность	Декстр оза	Левуло за	Галакто за	Мальто за	Лактоз а	Сахаро за	Рафино за	Декстр ин
-----------------	---------------	--------------	---------------	--------------	-------------	--------------	--------------	--------------

A = кислая реакци я		A Г	A Г	A Г	A Г	A Г	A Г	A	A
G = газооб разова ние									
A	A								
Группа кишечн ика.		B. coli commu nis	+	++	++	++	O	++	++
++-----	+	++	++	++	++	++	++	++	++

-									
палочк и									
commu nior									
B. lactis aerogen es	-	++	+	+	++	++	O	O	++
B. acid lactici	-	++	+++	++	+	+	O	O	O
.	-	++	++	++	++	++	++	++	++
пневмо ния									
B cloacea e(A)	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Группа Гертне ра.									
B. enteriti dis	+	++	++	++	++	O	O	O	O
Б. paratyp	+	++	++	++	++	O'	O'	O'	O'

hosus a									
Б. paratyp hosus Б	+	++	++	++	++	O'	O'	O'	O'
Б. choler æ suum	+	++	++	++	++	O	O		O
В. хищник	+	++	++	++	++	O	O		
<i>Группы Эберт а.</i>									
В. typhosu s	+	+	+	+	+	O	O	O	+
О О. dysente riæ (сига)	-	+	+	+	O'	O'	O'	O'	O'
Б. дизент ерия (Флекс нера)	-	+	+	+	+	O	O	±	O
Б. алкали цины фекали са	+	O	O	O	O	O	O	O	O
Примеч ания к таблиц е:	(B)	(C)							

	Инулин,	салиц	глице	Dulc	Mann	сорб	инд	Лакмусовое	молоко
	ин	рин	ite	ite	ита	ол			
с=кислу	В Г	В Г	В Г	В Г	В Г	В Г		в	конце

В. suipestife r в Eberth группы.	O'	O'	O'	++	++	++	-	+	-
Б. typhosus	O'	O'	O'	O'	+	+	-	+	+
Б. дизентер ия (Шига)	O	O	O	O	O	O	-	+	-
- В. дизенте рия (Флексн ера)	O	O	O	O	+	O	±	+	-
----- ----- ----- ----- алкалино вые веществ а	O	O	O	O	O	O	-	-	-
Примеча ния к таблице:							(D)	(E)----- -----	

Примечания к таблице:

(A) * разжижает желатин.

(B) + = подвижный. - = неподвижный.

(C) + = образование кислоты или газа. ± = незначительное образование кислоты. O = без изменений.

(D) + = образование индола. ± = незначительное образование индола. - = индол не образуется.

(E) + = образование кислоты. - = образование щелочи. O = реакция не изменилась. C = сгусток.

21. Определите патогенность выделенных стрептококков для мышей (подкожная инокуляция) и кроликов (внутривенная инокуляция).

На первой странице-вкладыше воспроизведен бланк из авторской книги лабораторных анализов воды, с помощью которой с минимальными затратами труда можно вести точную запись каждого исследованного образца.

Б. Метод концентрирования.

Остальные организмы, упомянутые на стр. 426, удобнее искать методом концентрирования.

Сбор образца.—Количество воды, необходимое для этого метода исследования, составляет около 2000 °с, и для его получения обычно выбирают обычную квартовую бутылку Winchester из синего стекла, стерилизованную в печи с горячим воздухом, а поверх нее закрывают бумажной или пергаментной крышкой, скрепленной бечевкой. Бутылка может быть упакована в деревянную коробку или в обычный плетеный футляр. Метод отбора пробы идентичен методу, описанному в разделе "Количественное исследование"; однако нет такой же настоятельной необходимости упаковывать пробу во лед для передачи в лабораторию.

Требуемое оборудование:

Стерильная фарфоровая свеча-фильтр с открытым горлышком Chamberland или Doulton "white", снабженная резиновой шайбой.

Резиновая пробка для горловины фильтрующей свечи с перфорацией в одно отверстие.

Колба для сыворотки Kitasato, вместимость 2500 °с.

Воздушный насос Geryk или водяной нагнетательный насос.

Бутылка Вульфа, приспособленная в качестве промывочной и содержащая серную кислоту (действует как предохранительный клапан между фильтром и насосом).

Напорная трубка, зажимы, зажимной кран.

Подставка для реторт с кольцом и зажимом.

Резиновая пробка для горлышка Winchester quart, перфорированная двумя отверстиями и снабженная одной прямой стеклянной трубкой длиной 6 см и одним V-образным куском стеклянной трубки, длина одного рукава 32 см, другого 52 см, более короткий рукав заткнут ватой. Перед использованием резиновую пробку необходимо простерилизовать кипячением, а стеклянную трубку - горячим воздухом.

Колба, содержащая 250-градусный стерильный бульон.

Щетка для пробирок по размеру просвета свечи, помещенной в стерильную пробирку (и предварительно стерилизованную сухим нагревом или кипячением).

Коробка стерильных пипеток, 10°с в десятых долях.

Коробка стерильных пипеток, 1 куб. см в десятых.

Коробка стерильных пипеток, 1 ст.л. в сотых долях.

Пробирки с различными питательными средами (в соответствии с требованиями).

Двенадцать тьюбиков Бюхнера с резиновыми пробками.

Таблетки пирогалловой кислоты.

Таблетки каустической соды.

No. _____

Sample of _____

From _____

Labelled _____

Date of Collection _____

Received _____

Reported _____

per _____

I. QUANTITATIVE.—		24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	7 days.	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	7 days.	Living bacteria growing aerobically at 20° C. per cc. = ...	Living bacteria growing anaerobically at 37° C. per cc. = ...	Moulds growing aerobically at 20° C. per cc. = ...	Ratio
Gelatin Plates.	0.2 cc.						0.2 cc.								
	0.3 cc.						0.3 cc.								
	0.5 cc.						0.5 cc.								
Agar Plates.	0.1 cc.						0.2 cc.								
	0.3 cc.						0.3 cc.								
	1.0 cc.						0.5 cc.								
Wet Gelatin Plates.	0.2 cc.						0.5 cc.								
	0.3 cc.						1.0 cc.								
	0.5 cc.														

II. QUALITATIVE.—

A. In Bile Salt Broth (incubated anaerobically at 42° C.)		24 hrs.	48 hrs.	Acid Gas		Plated Tubes	Isolated Colonies	B. coli commens. present in cc., but not in cc.
For B. coli commens.	1 = 0.1 cc. original water ...							
	2 = 1 cc. " "							
	3 = 2 cc. " "							
	4 = 5 cc. " "							
	5 = 10 cc. original water, or 0.05 cc. Emulsion ...							
	6 = 20 cc. " "							
	7 = 25 cc. " "							
	8 = 50 cc. " "							
	9 = 100 cc. " "							
	10 = 250 cc. " "							
	11 = 500 cc. " "							
	12 = 1000 cc. " "							

B. For Streptococci.		24 hrs.	48 hrs.	Acid Gas		Plated Tubes	Isolated Colonies	Streptococci present in cc., but not in cc.
Microscopical Examination in hanging drop of Bile Salt Broth Tubes (A)	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
	9							
	10							
	11							
	12							

C. For B. enteritidis sporogones.		24 hours	48 hours	acid clot gas.		Guinea pig. with whey from tube	B. enteritidis sporogones present in cc., but not in cc.
In Litmus Milk (incubated anaerobically at 42° C. after partial sterilisation at 80° C. for 15 minutes).	1 = 1 cc. original water ...						
	2 = 2 cc. " "						
	3 = 5 cc. " "						
	4 = 10 cc. original water, or 0.05 cc. Emulsion ...						
	5 = 20 cc. " "						
	6 = 25 cc. " "						
	7 = 50 cc. " "						
	8 = 100 cc. " "						
	9 = 250 cc. " "						
	10 = 500 cc. " "						

Signed _____

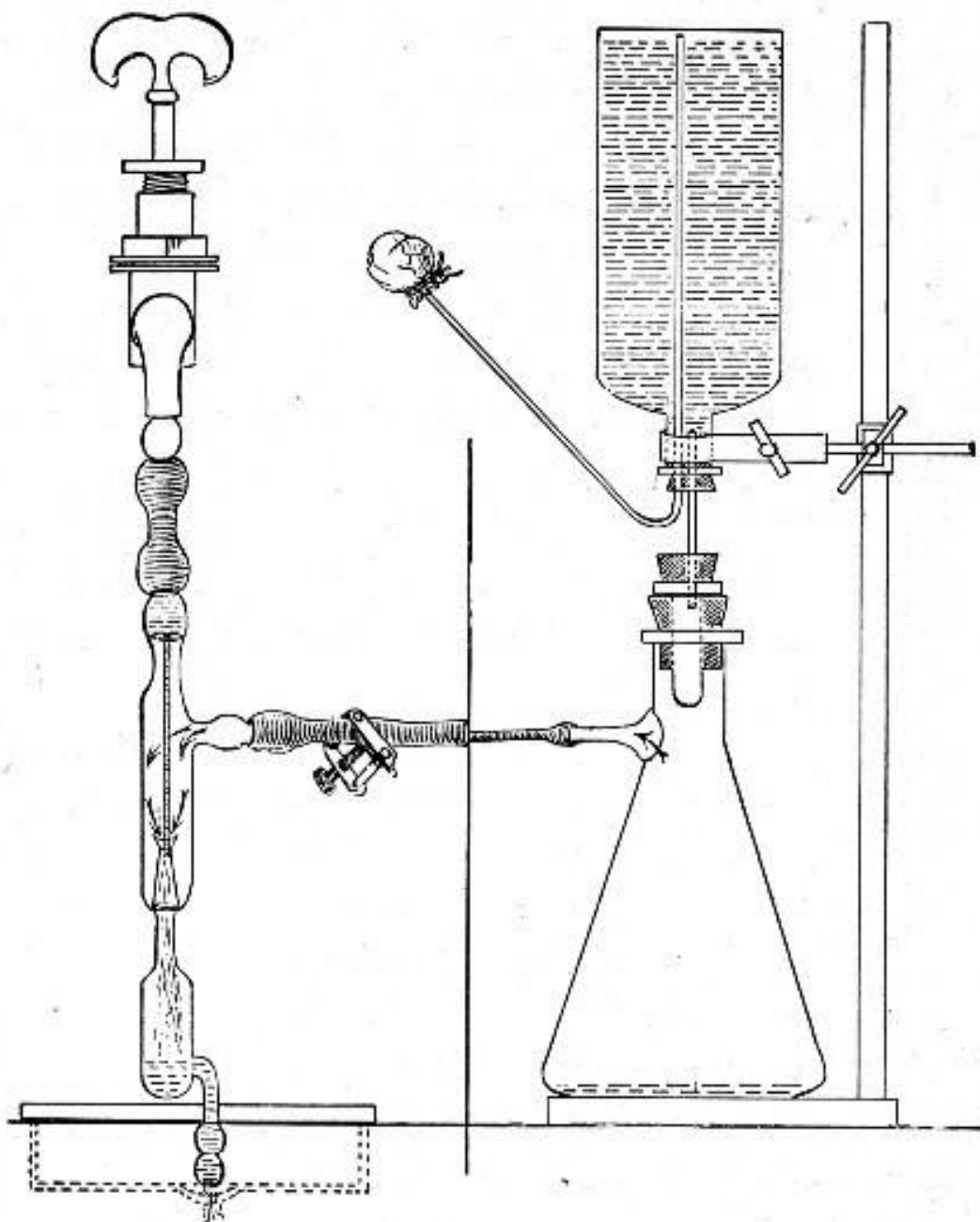


Рис. 209.

Устройство для фильтрации воды. Часть рисунка слева от вертикальной линии нарисована в большем масштабе, чем справа, чтобы показать детали насоса Шпренгеля.

Способ.—

1. Установите фильтрующее устройство, как показано на прилагаемой схеме (рис. 209), поместив промывочную емкость с серной кислотой между фильтровальной колбой и нагнетательным насосом (в положении, занятом на схеме центральной вертикальной линией), и наденьте другой винтовой зажим на резиновую трубку, соединяющую боковое плечо фильтровальной колбы с промывочной бутылкой.

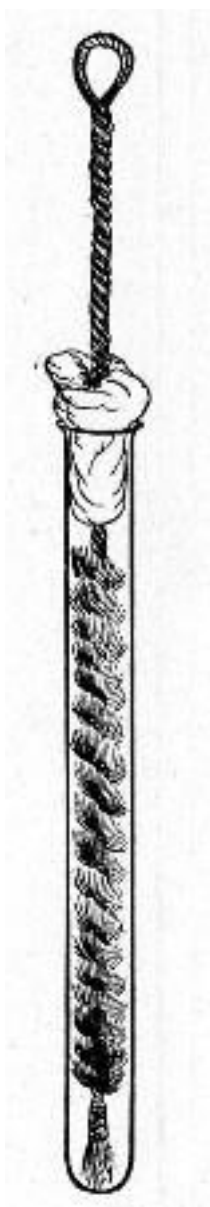


Рис. 210. Стерильная щетка для пробирок.

2. Процедите все 2000 мл воды через фильтровальную свечу.
3. По завершении нитрования завинтите зажимы и таким образом закройте две части напорных трубок.
4. Измените положение стеклянных трубок в бутылке Вульфа таким образом, чтобы та, которая находится ближе всего к воздушному насосу, теперь опускалась в серную кислоту.
5. Медленно откройте металлические зажимы и дайте воздуху постепенно пройти через кислоту и попасть в фильтрующую колбу, восстановив таким образом давление.
6. Снимите устройство, выньте пробку из горлышка свечи.
7. Влейте внутрь свечи пипеткой 10 мл стерильного бульона и с помощью стерильной щетки для пробирок (рис. 210) смешайте слизистый осадок, покрывающий свечу, с бульоном.

Практически все бактерии, содержащиеся в исходном объеме воды при 2000°с, теперь взвешены в 10°с бульона, так что 1 °с суспензии эквивалентен, с точки зрения содержащихся в ней организмов, 200°с исходной воды. (Некоторые бактерии, конечно, останутся на стенках фильтра и в его порах.)

До этого момента метод идентичен независимо от конкретного организма, присутствие которого желательно продемонстрировать; но с этого момента методы должны быть специально адаптированы для выделения определенных групп организмов или отдельных бактерий.

Группа кишечной палочки и брюшного тифа. -

1. Наберите девять тюбиков бульона из желчных солей (*видео* на странице 180), последовательно от 1 до 9.

2. К № 1 добавить 1°с } исходной пробы воды
2 добавить 2 °с } перед началом нитрования.
3 добавить 5 °с }

3. В оставшиеся пробирки с бульоном из желчных солей добавьте различные количества суспензии с помощью соответствующим образом отмеренных стерильных пипеток следующим образом:

№ 4 0,05 °с (эквивалентно 10°с исходной пробы воды).
№ 5 0,125 °с (эквивалентно 25 °с исходной пробы воды).
№ 6 0,25 °с (эквивалентно 50 °с исходной пробы воды).
№ 7 0,5 °с (эквивалентно 100 °с исходной пробы воды).
№ 8 1,0 °с (эквивалентно 200 °с исходной пробы воды).
№ 9 2,5 °с (эквивалентно 500°с исходной пробы воды).

4. Поместите каждую пробирку анаэробно в пробирку Бюхнера и инкубируйте при 42 °С.

5. Последующие этапы идентичны этапам, описанным в разделе "Метод обогащения" (см. стр. 428-431; Этапы с 8 по 18).

Альтернативные методы.—

Упомянуты несколько более старых методов изоляции представителей групп кишечной палочки и брюшного тифа, но они явно уступают уже описанным.

А) Карбильный метод:

1. Возьмите десять трубочек карбонизированного бульона (*видео* на странице 202) и пронумеруйте их последовательно от 1 до 10.

2. Инокулируйте в каждую пробирку разное количество пробы воды или суспензии, как в предыдущем методе.

3. Аэробная инкубация при 37 °С.

4. Исследуйте пробирки для культивирования после двадцатичетырехчасовой инкубации.

5. Из тех пробирок, на которых видны признаки роста, разлейте по тарелкам обычным способом, используя карболизированный желатин (*смотрите* стр. 202) вместо обычного желатина, и выдерживайте при 20 ° С в течение трех, четырех или пяти дней, по мере необходимости.

6. Субкультурация из любых колоний, которые появляются, и определение их идентичности по линиям, изложенным в предыдущем методе.

(Б) метод Парияетти:

1. Возьмите девять пробирок с бульоном Парияетти (*видео*, стр. 202) — т.е. по три, каждая из которых содержит 0,1 ст.л., 0,2 ст.л. и 0,5 ст.л. раствора Парияетти соответственно. Четко отметьте на внешней стороне каждого тюбика количество раствора Парияетти, которое он содержит.

2. В каждую пробирку добавьте разное количество исходной воды или суспензии и выдержите при 37°C.

3. Осмотрите пробирки с культурами после двадцатичетырех-сорока восьми часов инкубации и залейте питательным карболизированным или картофельным желатином из тех, которые уже выросли.

4. Удалите подозрительные колонии, если таковые появятся на чашках, повторно культивируйте их на различных средах и идентифицируйте.

(С) Метод Эльснера: Этот метод просто заключается в замене картофельного желатина Эльснера (*видео*, стр. 204) обычным питательным желатином в любом из ранее упомянутых методов.

(D) Метод свечи Камбье:

Обработайте большой объем пробы воды методом концентрирования (*видео*, стр. 434).

1. Снимите резиновую пробку с горлышка фильтрующей свечи, влейте внутрь нее 10-градусный стерильный бульон и эмульгируйте бактериальный осадок; снова закройте горлышко свечи комочком стерильной ваты.

2. Извлеките фильтровальную свечу из фильтровальной колбы и вставьте ее в горловину колбы или стеклянного цилиндра, содержащего стерильный бульон, в количестве, достаточном для того, чтобы она доставала почти до резиновой прокладки на свече.

3. Инкубировать в течение двадцати четырех-тридцати шести часов при температуре 37°C.

4. Из уже замутненного бульона в стеклянный цилиндр налейте желатиновые пластинки и выдержите при 20°C.

5. Субкультивируйте и идентифицируйте все появившиеся подозрительные колонии.

(Метод основан на предположении, что представители групп брюшного тифа и кишечной палочки проникают через фарфоровый фильтр изнутри в окружающий бульон быстрее, чем ассоциированные бактерии.)

B. Enteritidis Sporogenes.—

1. Перелейте 5 мл эмульсии из фильтровальной свечи в стерильную пробирку и тщательно закупорьте.
2. Поместите пробирку внутрь бензольной ванны, используемой для отделения спорозоносных организмов (*видео*, стр. 257), и выдержите при температуре 80° С в течение двадцати минут.
3. Пронумеруйте десять тюбиков лакмусовой бумажки последовательно от 1 до 10.
4. Извлеките пробирку из ванны с бензолом и хорошенько встряхните, чтобы споры равномерно распределились по жидкости.
5. В каждую пробирку с лакмусовым молочком добавьте отмеренное количество суспензии, соответствующее количеству, используемому для выделения группы *coli* (*смотрите* стр. 437).
6. Инкубируйте каждую пробирку анаэробно при 37 ° С. Анаэробных условий можно добиться, поместив культуры в пробирки Бюхнера или в аппарат Буллоха. Однако, если при приготовлении лакмусового молока использовалось цельное молоко, то слой сливок, который поднимается на поверхность, будет достаточно для обеспечения анаэробнобиоза; в то время как при использовании отделенного молока будет достаточно нанести на поверхность жидкости слой стерильного вазелина или жидкого парафина.
7. Провести исследование после двадцатичетырехчасовой инкубации. Примечание (при наличии *B. enteritidis sporogenes*)—
 - (a) Кислотная реакция среды, о чем свидетельствует цвет лакмусовой бумажки или ее полное обесцвечивание.
 - (b) Наличие свертывания и отделение прозрачной сыворотки.
 - (c) Наличие газа, на что указывают трещины и пузырьки в коагуляте, и, возможно, массы коагулята, вытесненные вверх по трубке почти до пробки.
8. Поместите пробирки, в которых нет признаков роста, в инкубатор еще на двадцать четыре часа и снова осмотрите, ориентируясь на те же точки.
9. Извлеките из пробирок Бюхнера те, которые свидетельствуют о росте, и осторожно отцеживайте сыворотку пипеткой; исследуйте сыворотку под микроскопом.
10. Сделайте подкожную прививку двум морским свинкам по 0,5 стакана сыворотки и наблюдайте за результатом.

Холерный вибрион.—

1. Пронумеруйте десять пробирок с пептоновой водой последовательно от 1 до 10.
2. В каждую пробирку с пептоновой водой добавьте отмеренное количество суспензии, соответствующее тем количествам, которые использовались для выделения представителей группы *coli* (*смотрите* стр. 437).

3. Инкубируйте аэробно при температуре 37 ° C в течение двадцати четырех часов. Внимательно осмотрите пробирки на предмет видимого роста, особенно образования тонких пленочек, которые, если они присутствуют, следует исследовать под микроскопом на наличие вибрионов, как с помощью окрашенных препаратов, так и с помощью свежих образцов при освещении темным фоном.
4. Инокулируйте свежие пробирки пептоновой водой из тех пробирок, в которых наблюдается образование пленок, — из самой пленки — и инкубируйте при 37 ° C в течение двадцати четырех часов.
5. Проверьте саму пептонную воду на наличие индола и нитритов, добавив чистый концентрированный H_2SO_4 .
5. Приготовьте желатиновые и агаровые пластинки обычным способом из таких пробирок, в которых наблюдается образование пленок.
6. Соберите с чашек любые колонии, напоминающие колонии холерного вибриона, и субкультивируйте на всех обычных лабораторных средах.
7. Протестируйте выделенный вибрион на агглютинацию с сывороткой животного, иммунизированного к холерному вибриону.

B. Anthracis.—

1. Перелейте 5 мл эмульсии из фильтровальной свечи в стерильную пробирку и тщательно закупорьте.
2. Поместите пробирку внутрь бензольной ванны, используемой для отделения спорозоносных организмов (*видео*, стр. 257), и выдержите при температуре 80° C в течение двадцати минут.
3. Привейте *молодой* белой крысе подкожно (на внутренней стороне одной из задних лап) 1 ч.л. эмульсии. Наблюдайте в течение жизни и, если животное умирает, проведите полное посмертное обследование.
4. Растопите три тюбика питательного агара в кипящей воде и охладите до 42°C.
5. Пронумеруйте пробирки 1, 2 и 3. В пробирку № 1 добавьте 0,2 ч.л. суспензии, в пробирку № 2 - 0,3 ч.л. суспензии, а в пробирку № 3 - 0,5 ч.л. суспензии и разлейте по тарелкам.
6. Инкубировать при температуре 37°C в течение двадцати четырех-сорока восьми часов.
7. Выберите любые колонии, напоминающие колонии сибирской язвы, и субкультивируйте на всех обычных лабораторных средах.
8. Инокулируйте другую молодую белую крысу, как в 3, используя две полные петли агарового субкультура, эмульгированного с 1 ст.л. стерильного бульона. Наблюдайте за животным при жизни и, если оно умирает, проведите полное посмертное обследование.

Б. Тетани.—

1. Действуйте, как описано выше, на этапах 1 и 2 для выделения *B. anthracis*.

2. Добавьте по 1 ч.л. суспензии в каждую из трех пробирок с глюкозоформатным бульоном и анаэробно инкубируйте в пробирках Бюхнера при 37°C.
3. Из тех пробирок, в которых наблюдается видимый рост (с выделением газов или без них) после двадцатичетырехчасовой инкубации, привейте морских свинок подкожно (под кожу живота), используя в качестве дозы 0,1 ч.л. бульонного раствора для разведения. Внимательно наблюдайте при жизни и, если наступит смерть, проведите полное посмертное обследование.
4. Из тех же пробирок налейте в чашки агар и инкубируйте анаэробно в аппарате Буллоха при 37°C.
5. Субкультивируйте подозрительные колонии на различных средах, инкубируйте анаэробно, проводя контрольные культивирования на глюкозоформатном агаре, stab и streak, для инкубации аэробно и проведения дальнейших экспериментов по инокуляции полученных наростов.

ЭКСПЕРТИЗА МОЛОКА.

"Однокоровое" или "цельное" молоко, полученное от животного, по-видимому здорового (то есть животного без каких-либо явных поражений вымени или сосков), с соблюдением обычных мер предосторожности в отношении чистоты, предотвращения попадания пыли и т.д., содержит лишь небольшое количество микроорганизмов. При работе с молоком от одной коровы, полученным от подозреваемого или явно больного животного, полный анализ должен включать исследование (как качественное, так и количественное) образцов (а) переднего молока, (б) среднего молока, (с) выделений и, по возможности, из каждой четверти вымени. "Смешанное" молоко, с другой стороны, к моменту выхода из рук розничного продавца обычно содержит столько микроорганизмов, сколько в равном объеме сточных вод, и действительно, при проверке оно обрабатывается как таковое.

Однако можно собирать и хранить молочную смесь таким чистым способом, чтобы содержание в ней микробов не превышало 5000 микроорганизмов на кубический сантиметр. Такая сравнительная свобода от посторонних бактерий обычно обеспечивается поставщиком только тогда, когда он прибегает к процессу пастеризации (нагревание молока до 65 ° C в течение двадцати минут или до 77 ° C в течение одной минуты) или более простому способу добавления консервантов в молоко. В случае образцов смешанного молока всегда следует запрашивать информацию о применении этих методов для уничтожения бактерий, и в этой связи полезными будут следующие тесты:

1. Сырое молоко (Саул).

К 10%-ному молоку в пробирке добавьте 1%-ную порцию водный раствор ortal (Орто-метил-амино-фенола сульфата), недавно подготовил и перемешать. Далее добавляют 0,2 гр.гр. в 3 процента. перекиси раствора водорода. Появление кирпично-красного цвета в течение 30 секунд указывает на сырое молоко. Молоко, нагретое до 74° C. в течение тридцати минут, не меняет цвет; при нагревании до 75° C. только в течение десяти минут после двухминутного отстаивания появляется кирпично-красный цвет.

2. Борная кислота.

Выпарите досуха 50 г молока, слегка щелочного до лакмусовой бумажки, затем сожгите.

Растворите в дистиллированной воде, добавьте небольшой избыток разбавленной соляной кислоты и снова выпарите досуха.

Растворите остаток в небольшом количестве горячей воды и смочите этим раствором лист бумаги из-под куркумы. Высушите бумагу из-под куркумы. *Розовый* или *вишнево-красный* цвет = бура или борная кислота.

3. Формальдегид (Хенер).

К 10-градусному молоку в пробирке медленно добавляйте 5-градусную концентрированную *товарную* серную кислоту, чтобы две жидкости не смешались. Держите тюбик вертикально и очень осторожно перемешивайте. *Фиолетовая зона* на стыке двух жидкостей = формальдегид.

4. Перекись водорода.

К 10-градусному молоку (разбавленному равным количеством воды) в пробирке для теста добавьте 0,4 градуса 4-процентного. спиртовой раствор бензидина и 0,2 стакана уксусной кислоты. *Синяя окраска* смеси = перекись водорода.

5. Салициловая кислота.

Осадок caseinogen путем добавления уксусной кислоты и фильтруют. К фильтрату добавляют несколько капель 1 процента. водный раствор хлорного железа. *Фиолетовая окраска* = салициловая кислота.

6. Карбонат или бикарбонат натрия.

К 10 каплям молока в пробирке добавьте 10 капель спирта и 0,3 капельки 1-процентного. спиртовой раствор розоловой кислоты. *Коричневатый* цвет = чистое молоко; *розовый* цвет = консервированное молоко.

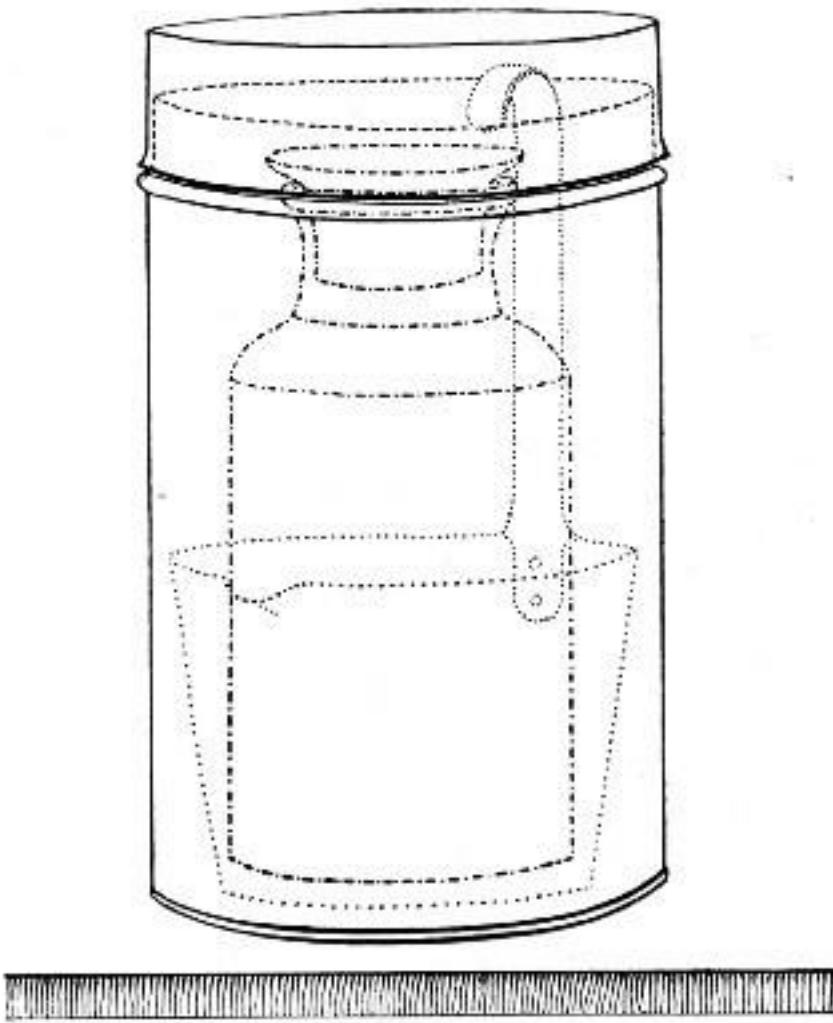


Рис. 211. Бутылка для сбора молока

и ковшик в футляре.

Количественный.—

Отбор образцов.—

Устройство, используемое для отбора пробы молочной смеси для розничной продажи, состоит из цилиндрического медного корпуса диаметром 16 см. высотой 9 см в диаметре, снабженный "откидной" крышкой, внутри которой находится ковшик для молока, также изготовленный из меди; и внутри него, опять же, стеклянная бутылка с широким горлышком и пробкой емкостью около 250 мл (примерно 14 см в высоту и 7 см в диаметре), с планшетом для заметок, обработанным пескоструйной обработкой сбоку. Медный цилиндр и его содержимое, защищенные от встряхивания упаковкой из ваты, стерилизуют в печи с горячим воздухом (рис. 26).

При отборе образца,

1. Снимите крышку с баллона.
2. Вытяните вату.

3. Поднимите бутылку и ковшик вместе.
4. Наберите молоко в стерильный ковш и перелейте его непосредственно в стерильную бутылку.
5. Введите сведения, необходимые для идентификации образца, на планшете с помощью грифельного карандаша или ручки с чернилами.
6. Упакуйте прибор в контейнер со льдом для передачи в лабораторию точно так же, как и обычную пробу воды.

"Цельное" молоко с преимуществом можно собирать непосредственно в стерильную бутылочку, поскольку горлышко достаточно широкое, чтобы дояр мог направлять в него струю молока.

Сгущенное молоко необходимо разбавить стерильной дистиллированной водой в соответствии с указаниями, напечатанными на этикетке, затем обработать как обычное молоко.

Требуемое оборудование:

Упаковка стерильных капсул (емкостью 25 куб.см).
Коробка стерильных градуированных пипеток, 10 мл (в десятых долях кубического сантиметра).
Коробка стерильных градуированных пипеток, 1 куб.см (в десятых долях кубического сантиметра).
Колба, содержащая стерильный бульон на 250°С.
Высокий цилиндр, содержащий 2% раствор лизола.
Подставка для выравнивания тарелок.
Ящик со стерильными тарелками.
Трубочки с питательным желатином или желатиновым агаром.
Трубочки с желатиновым суслом.
Пробирки с питательным агаром.
Водяная баня регулируется при температуре 42 °С.
Горелка Бунзена.
Смазочный карандаш.

Способ.—

1. Разложите четыре стерильные капсулы в ряд; пронумеруйте их I, II, III и IV.
2. Налейте 9 ст.л. стерильного бульона в первую капсулу и 9,9 ст.л. бульона в каждую из трех оставшихся капсул.
3. Извлеките 1 ст.л. молока из одной из бутылочек с помощью стерильной пипетки и добавьте его в бульон в капсуле I; тщательно перемешайте, повторно наполняя и опорожняя пипетку.
4. Извлеките 0,1 стакана молочного бульона из капсулы I, добавьте его к содержимому капсулы II и перемешайте, как раньше.
5. Аналогичным образом добавьте 0,1 ч.л. содержимого капсулы II к капсуле III; а затем 0,1 ч.л. содержимого капсулы III к капсуле IV.

Тогда 1 ч.л. разведения I содержит 0,1 ч.л. пробы молока.

1 ч.л. разведения II содержит 0,001 ч.л. пробы молока.

1 ч.л. разведения III содержит 0,00001 ч.л. пробы молока.

1 ч.л. разведения IV содержит 0,0000001 ч.л. пробы молока.

6. Растопите желатин и трубочки с агаром в кипящей воде; затем переложите на водяную баню и остудите до 42°C.

7. Пронумеруйте желатиновые трубочки последовательно от 1 до 12.

8. Инокулируйте пробирки различными количествами материала следующим образом:

В пробирку № 1 добавьте 1,0 ч.л. образца молока.

2 добавьте 0,1 стакана молока для пробы.

{ 3 добавьте 1,0 ст.л. из капсулы I.

{ 4 добавьте 0,1 ст.л. из капсулы I.

{ 5 добавьте 1,0 ст.л. из капсулы II.

{ 6 добавьте 0,1 ст.л. из капсулы II.

{ 7 добавьте 0,5 ст.л. из капсулы III.

{ 8 добавьте 0,3 ст.л. из капсулы III.

{ 9 добавьте 0,2 ст.л. из капсулы III.

{ 10 добавьте 0,5 ст.л. из капсулы IV.

{ 11 добавьте 0,3 ст.л. из капсулы IV.

{ 12 добавьте 0,2 ст. Л. из капсулы IV.

9. Разлейте желатин по пластинам из тюбиков, наклейте этикетки и выдержите при 20°C.

10. Разжижите пять желатиновых трубочек из-под сусла и добавьте в них 1,0 стакана образца молока и аналогичное количество разбавленного молока из капсул I, II, III и IV соответственно.

11. Разлейте желатиновое сусло по пластинам, разлейте по этикеткам и выдержите при 20°C.

12. Инокулируйте пробирки со сжиженным агаром следующим образом:

В пробирку № 1 добавьте 0,1% образца молока.

2 добавьте 0,1 ст.л. из капсулы I.

3 добавьте 0,1 ст.л. из капсулы II.

4 добавьте 0,1 ст.л. из капсулы III.

5 добавьте 1,0 ст.л. из капсулы IV. }

6 добавьте 0,1 ст.л. из капсулы IV. }

13. Разлейте по чашкам из пробирок с агаром, наклейте этикетки и инкубируйте при 37°C.

14. После двадцатичетырехчасовой инкубации "осмотрите", а после сорока восьми часов инкубации "сосчитайте" чашки с агаром и оцените количество "микроорганизмов, растущих при 37°C", присутствующих на кубический сантиметр образца молока.

15. После трех, четырех или пятидневной инкубации "сосчитайте" желатиновые пластинки и оцените по ним количество "микроорганизмов, растущих при 20 °С", присутствующих на кубический сантиметр образца молока.

16. Через аналогичный промежуток времени "подсчитайте" желатиновые пластинки для сусли и оцените количество плесени и дрожжей на кубический сантиметр образца молока.

Примечание.—Многие наблюдатели предпочитают использовать желатиновый агар (см. стр. 193) для количественного анализа. В этом случае желатино-агаровые пластины следует разливать из пробирок, содержащих количество материала, указанное на этапе 8, инкубировать при температуре от 28°С до 30°С. и через пять дней регистрировать "общее количество организмов, развивающихся при 28°С".

Качественный. Качественное бактериологическое исследование молока в основном направлено на выявление присутствия одной или нескольких из следующих патогенных бактерий и, при наличии, на оценку их численной частоты.

Представители группы Коли-брюшного тифа.

Холерный вибрион.

Streptococcus pyogenes longus.

Микрококк мелитенсис.

Золотистый стафилококк.

Bacillus enteritidis sporogenes.

Дифтерийная палочка.

Туберкулезная палочка.

Некоторые из них возникают в результате случайного загрязнения либо в результате подачи воды на коровью ферму, либо от работников фермы, в то время как другие поступают непосредственно от коровы.

Для исследования молока, как и для исследования воды, доступны два метода, а именно: обогащение и концентрирование — первый используется для выявления бактерий кишечного происхождения, второй - для выделения микроорганизмов дифтерии и туберкулеза. Первое, что необходимо в последнем процессе, - это концентрация бактериального содержимого большого объема пробы в небольшом объеме; но в случае молока фильтрация заменяется тщательным центрифугированием.

Требуемое оборудование:

Большая центробежная машина. Чтобы эта машина была действительно полезна при бактериологическом исследовании молока, она должна соответствовать следующим требованиям:

1. Центробежная машина должна быть такого размера и иметь пробирки или бутылки такой вместимости, чтобы можно было обрабатывать от 200 до 500 г молока за один раз.
2. Скорость центрифугирования должна составлять от 2500 до 3000 оборотов в минуту.

3. Часть машины, предназначенная для транспортировки труб, должна представлять собой металлический диск достаточного веса, обеспечивающий хорошее "боковое" движение, продолжающееся в течение значительного периода времени. Другими словами, машина должна работать очень постепенно и медленно после отключения движущей силы, что исключает любое нарушение взаимного расположения твердых частиц в центрифугируемом растворе.

4. Предпочтительно, чтобы машина приводилась в действие электричеством, но в случае машин с ручным приводом -

(а) Передача должна быть устроена таким образом, чтобы требуемая частота вращения достигалась не более чем при сорока-пятидесяти оборотах кривошипной рукоятки в минуту, чтобы ее можно было поддерживать в течение двадцати-тридцати минут без чрезмерных усилий.

(b) Используемая ручка должна быть снабжена специальным креплением (*например, сцеплением, подобным тому, которое используется для свободного колеса велосипеда*) или должна легко отсоединяться, чтобы при прекращении вращения ручка из-за своего веса и сопротивления воздуха не действовала как тормоз и не останавливала машину слишком внезапно..

Одна из немногих удовлетворительных машин этого класса показана на рисунке 212.

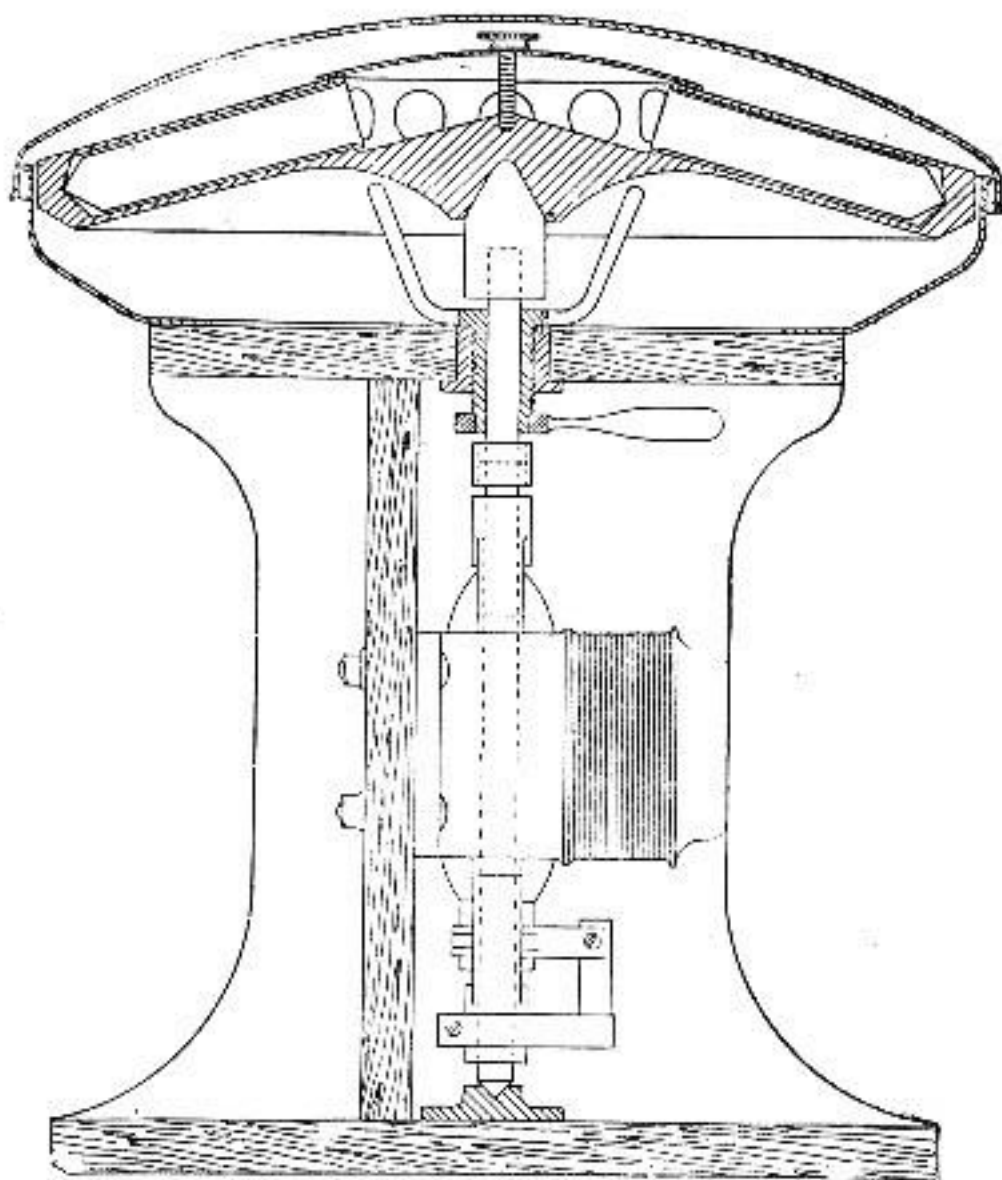


Рис.

212. Центробежная машина с электрическим приводом, с гибким (сломанным) шпинделем, окруженным возбуждающими магнитами двигателя.

Стерильные центробежные пробирки емкостью примерно 60-70 °с, сужающиеся к заостренному концу, закупоренные ватой.

Небольшая центробежная машина для работы с двумя трубками производительностью 10°с со скоростью от 2500 до 3000 оборотов в минуту, предпочтительно приводимая в действие электричеством, типа, указанного на стр. 327 (рис. 162).

Стерильные центробежные пробирки емкостью 10°с с дистальным концом, суженным до узкой трубки, с градуировкой в сотые доли кубического сантиметра (рис. 213).

Сверло для стерилизованных пробок.

Коробка стерильных пипеток, 10 °с (в десятых долях кубического сантиметра).

Коробка стерильных пипеток, 1 куб.см (в десятых долях кубического сантиметра).

Стерильные сосковые пипетки.

Колба со стерильным физиологическим раствором.

Способ.—

1. Налейте по 50 мл образца молока в каждую из четырех пробирок, замените ватные пробки прочными резиновыми пробками (стерилизованными кипячением) и установите пробирки в центробежную машину.

Примечание.—Один или два кубических сантиметра жидкого парафина, добавленного в емкости центрифуги перед вставкой стеклянных пробирок, устраняют любой риск их поломки.

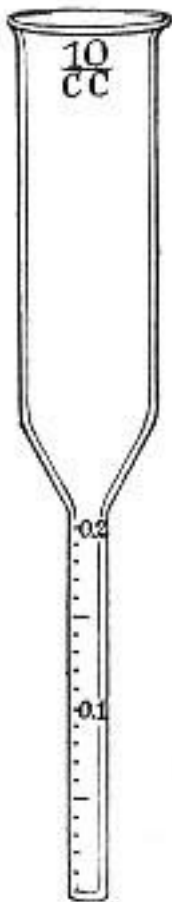


Рис. 213. Трубки для отстойника молока.



Рис. 214.—Молоко в центрифужной пробирке.

2. Центрифугируйте образец молока в течение тридцати минут со скоростью 2500 оборотов в минуту.
3. Отключите двигатель и дайте машине постепенно сбавить скорость.
4. Извлеките пробирки с молоком из центрифуги. Теперь на каждой пробирке будет показано (рис. 214):
 - (а) поверхностный слой сливок (различающийся по толщине у разных образцов), сконденсированный в полутвердую массу, в которой, как можно показать, содержатся некоторые микроорганизмы и небольшое количество лейкоцитов.
 - (б) Центральный слой отделенного молока, тонкий, водянистый, опалесцирующий и содержащий чрезвычайно мало бактерий.
 - (с) осадок или отложения, состоящие из подавляющего большинства содержащихся в них бактерий и лейкоцитов вместе с посторонними веществами, такими как грязь, волосы, эпителиальные клетки, фекальный мусор и т.д.

5. Снимите резиновую пробку и извлеките центральную пробку крема из каждого тюбика с помощью стерильной пробкорезки; поместите эти массы крема в две стерильные капсулы. Обозначьте С¹ и С².

6. С помощью стерильных пипеток удалите из каждой пробирки все отделенное молоко, кроме одного или двух последних капель.

7. Тщательно перемешайте отложения с остатками молока, пипеткой перелейте смесь из каждой пары пробирок в одну стерильную пробирку 10°с (градуированную) с помощью стерильных сосковых пипеток, затем заполните до отметки 10 °с стерильным физиологическим раствором и перемешайте. Обозначьте D¹ и D².

8. Поместите две пробирки со смешанным осадком в центрифугу, отрегулируйте путем добавления или уменьшения количества физиологического раствора, чтобы они точно уравнивались друг друга, и центрифугируйте в течение десяти минут.

Примечание.—В каждой пробирке теперь содержится осадок от 100 °с образца молока, и количество можно считать в сотых долях сантиметра. Умножение этой цифры на 100 даст количество "Явной нечистоты" в "частях на миллион" — обычный метод учета данного качества молока.

9. Отцедите пипеткой всю надосадочную жидкость и переверните пробирку для слива на салфетку из стерилизованной ваты, находящуюся в мензурке. (Впоследствии эта шерсть кремируется.)

10. Исследуйте крем (С¹) и осадок (D¹) под микроскопом—

а) В препаратах для подвешивания.

(b) В пленочных препаратах, окрашенных карболовым метиленовым синим, по методу Грамма, по методу Нейссера и по методу Циля-Нельсена.

Обратите внимание на наличие или отсутствие измененных и неизмененных растительных волокон; клеток гноя, кровяных дисков; кокков в группах или цепочках, дифтероидных палочек, граммотрицательных палочек или кокков, спор и кислотоустойчивых бактерий.

11. Адаптируйте заключительные этапы исследования к особым требованиям каждого отдельного образца, таким образом:

1. Представители группы кишечных палочек и брюшного тифа.-

1. Эмульгируйте осадок из второй центробежной пробирки (D²) 10-градусным стерильным бульоном и инокулируйте три пробирки бульоном из желчных солей следующим образом:

В пробирку № 1 добавьте 2,5 стакана молочной эмульсии (=25 стаканам исходного молока)

В пробирку № 2 добавьте 1,0 стакана молочной эмульсии (=10 стаканам исходного молока).

В пробирку № 3 добавьте 0,5 стакана молочной эмульсии (= 5 стаканам исходного молока).

2. Посеять в пробирку желчно-солевой бульон № 4 с 1 стаканом исходного молока.

3. Инокулируйте в другие пробирки бульон из желчных солей с ранее приготовленными растворами (см. стр. 445) следующим образом:

В пробирку № 5 добавить 1,0 ч.л. из капсулы I.

В пробирку № 6 добавить 0,1 ст.л. из капсулы I.

В пробирку № 7 добавить 1,0 ст.л. из капсулы II.

В пробирку № 8 добавить 0,1 ст.л. из капсулы II.

В пробирку № 9 добавить 1,0 ст.л. из капсулы III.

В пробирку № 10 добавить 0,1 ст.л. из капсулы III.

В пробирку № 11 добавить 1,0 ст.л. из капсулы IV.

В пробирку № 12 добавить 0,1 ст.л. из капсулы внутривенно.

и инкубируют анаэробно (в пробирках Бюхнера) при температуре 42°C в течение максимального периода в сорок восемь часов.

4. При обнаружении роста завершите исследование, как описано в соответствующем разделе исследования воды (см. Страницы с 428 по 431).

Примечание.— Бактерия *B. coli communis*, получаемая из выделений коров, почти повсеместно присутствует в больших или малых количествах в розничном молоке. Следовательно, его обнаружение, за исключением случаев, когда оно происходит в огромных количествах (когда это указывает на отсутствие чистоты), не имеет большого значения.

2. Холерный вибрион.— Инокулируйте пробирки с пептоновой водой, используя те же количества, что и при поиске представителей групп кишечной палочки и брюшного тифа (*видео* 1-3); инкубируйте аэробно при 37 ° C и завершите обследование, как описано в соответствующем разделе исследования воды (см. стр. 439).

3. *B. Enteritidis Sporogenes*.—Инокулируйте пробирки лакмусовым молоком в количестве, аналогичном тому, которое использовалось в предыдущих исследованиях, исключая пробирки № 1 (*видео* 1-3), поместите в дифференциальный стерилизатор при температуре 80 ° C на десять минут, а затем анаэробно инкубируйте при температуре 37 ° C в течение максимального периода в сорок восемь часов. Завершите исследование, как описано в соответствующем разделе исследования воды (см. стр. 438).

4. *B. Diphtheriae*.—

(A) 1. Посадите три набора серийных культур, по двенадцать пробирок в каждом наборе, из (a) крема C², (b) нанесите D¹ на наклонно уплотненную сыворотку крови и инкубируйте при 37°C.

2. Удалите все подозрительные колонии, которые могли появиться через двенадцать часов после инкубации, исследуйте под микроскопом и субкультивируйте на сыворотке крови и поместите в инкубатор; оригинальные пробирки верните в инкубатор.

3. Повторите процедуру после восемнадцатичасовой инкубации.

4. Из полученных наростов делают покровные препараты и окрашивают карболовым метиленовым синим, методом Найссера, методом Грамма. Субкультуры, такие как, по-

видимому, состоящие из дифтерийных палочек в растворе глюкозо-пептона. Обратите внимание на те, в которых происходит выработка кислоты.

5. Привейте морским свинкам подкожно один или два кубических сантиметра сорокавосьмичасовой глюкозы бульонного разведения, полученного в результате первого подкультивирования в каждом глюкозном ферментере, и наблюдайте за результатом.

6. Если наступает смерть, по-видимому, от дифтерийной токсикомании, привейте еще двум морским свинкам аналогичное количество смертельной культуры. Оставьте одно животное в качестве контрольного, а другому введите 1000 единиц антидифтерийной сыворотки. Если контрольный образец погибает, а обработанное животное выживает, доказательство идентичности организма, выделенного с бациллой Клебса-Леффлера, становится абсолютным.

7. Сделайте подкожную прививку морским свинкам отфильтрованным раствором глюкозного бульона (токсины?) и наблюдайте за результатом.

(В) 1. Эмульгируйте оставшийся осадок стерильным бульоном с 5 ст.л. и привейте двум морским свинкам, таким образом: морской свинке *a*, подкожно эмульсией с 1 ст.л.; морской свинке *b*, подкожно эмульсией с 2 ст.л.; и наблюдайте за результатом.

2. Если одно или оба привитых животных умирают, проведите полное посмертное обследование и постарайтесь изолировать патогенные организмы из локального очага поражения. Подтвердите их личность, как указано в пунктах А5 и 6 (*видео выше*).

5. Туберкулезная палочка.—

(А) 1. Сделайте прививку каждой из трех морских свинок (предварительно протестированных туберкулином, чтобы доказать отсутствие у них спонтанного туберкулеза) подкожно с внутренней стороны сгиба левого колена, при этом в одной или другой пробирке (D¹ или D²) останется 1 ч.л. эмульсии для депонирования.

2. Введите небольшое количество крема в подкожный карман, подготовленный на внутренней стороне сгиба правого колена каждого из этих трех животных. Наложите на рану герметичную повязку.

3. Внимательно наблюдайте и точно взвешивайте каждый день.

4. Убейте одну морскую свинку в конце второй недели и проведите полное посмертное исследование.

5. Если результат обследования отрицательный или неубедительный, забейте вторую морскую свинку в конце третьей недели и тщательно осмотрите.

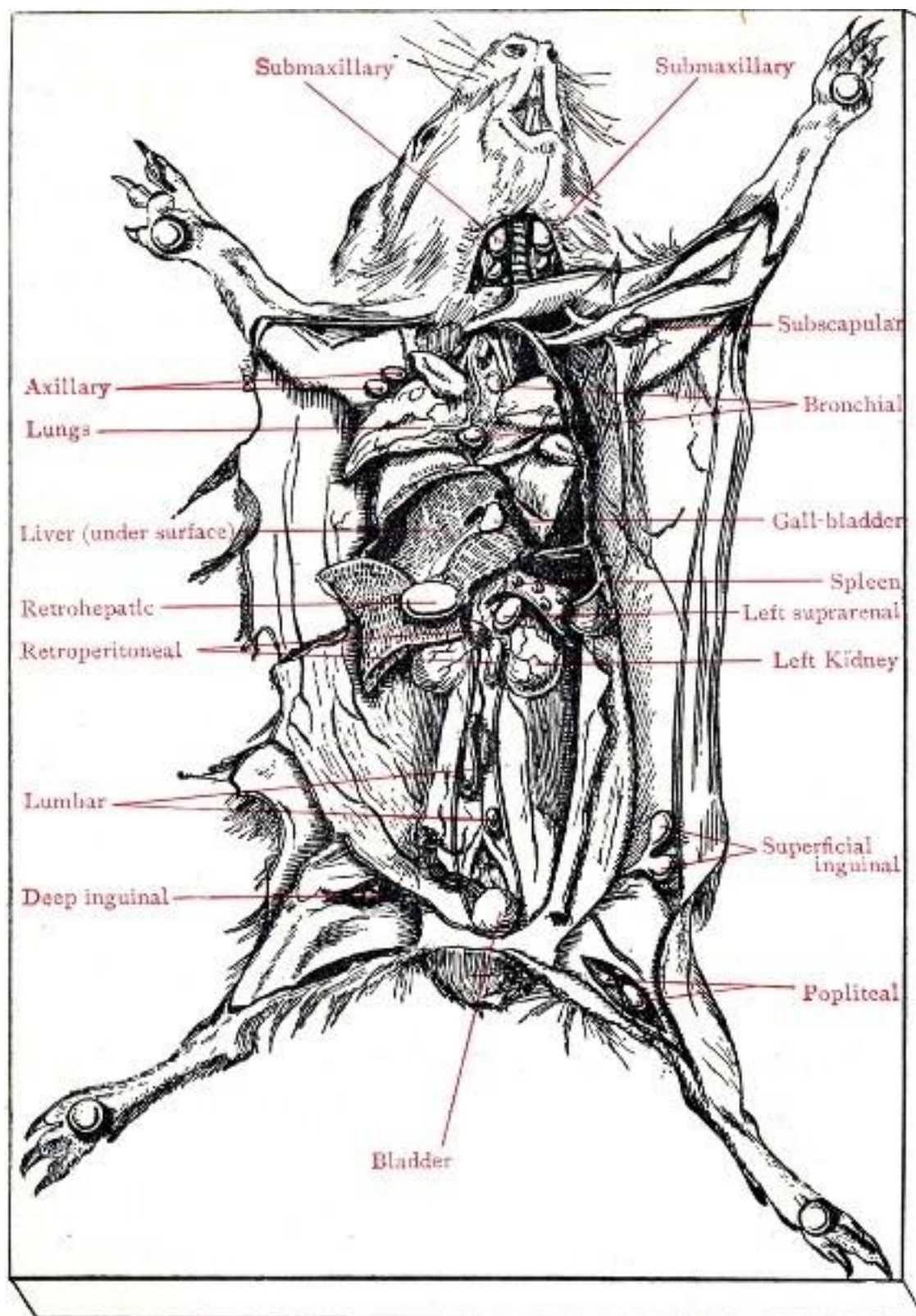


Рис. 215. Труп

морской свинки, экспериментально инфицированной *B. tuberculosis*.

6. Если результат по-прежнему отрицательный или безрезультатный, забейте третью морскую свинку в конце *шестой* недели. Проведите тщательное вскрытие. Исследуйте материал из любых казеозных желез под микроскопом и свободно вводите на яичную среду Дорсета.

Примечание.—Каждое посмертное обследование животных, инфицированных туберкулезным материалом, должно включать исследование невооруженным глазом и под микроскопом подколенных, поверхностных и глубоких паховых, подвздошных, поясничных и подмышечных желез с каждой стороны тела, а также забрюшинных, бронхиальных и грудных желез, селезенки, печени и легких (рис. 215).

(B) 1. Тщательно перемешайте все имеющиеся сливки и осадок от образца молока и перелейте в стерильную колбу Эрленмейера.

2. Обработайте смесь антиформиновым методом (см. Приложение, стр. 502).

3. Привейте каждой из двух морских свинок внутрибрюшинно половину полученной таким образом эмульсии.

4. Убейте одну из морских свинок в конце первой недели и тщательно осмотрите.

5. Вторую морскую свинку забейте в конце второй недели и тщательно осмотрите.

6. Оставшуюся часть отложений используйте для микроскопического исследования и культивирования на яйцеклеточной среде Dorset.

Примечание.—Результат микроскопического исследования на наличие *B. tuberculosis* не имеет никакого значения, если он не подтвержден результатами экспериментов по прививке.

6. Streptococcus Pyogenes Longus.—

(A) 1. Разложите пластинки поочередно на нутрозном агаре. Также проводят серийное культивирование растений на наклонном питательном агаре (шесть пробирок подряд).

2. Если в результате роста образуются колонии, похожие на колонии стрептококка, в первую очередь проведите субкультуру на агаре и в бульоне и тщательно изучите.

(B) 1. Поместите большую порцию осадка D² в каждую из трех пробирок с глюкозоформинатным бульоном и выдерживайте в анаэробных условиях (в пробирках Бюхнера) в течение двадцати четырех часов при 37 °C.

2. Если полученный рост напоминает рост стрептококка, проведите субкультуру на питательном агаре.

3. Подготовьте субкультуры любых подозрительных колоний, которые появятся, на всех обычных средах и тщательно изучите.

Если стрептококк успешно выделен, привейте мышам, морским свинкам и кроликам образцы бульонной сыворотки, чтобы определить его патогенность и вирулентность.

7. Золотистый стафилококк.—

1. Тщательно изучите рост при серийном культивировании сыворотки крови, приготовленной для выделения *B. diphtheriae*, и при серийном культивировании на агаре для выделения стрептококков после сорока восьми часов инкубации.

2. Оборвите все подозрительные колонии оранжевого цвета, высадите на наклонный агар и инкубируйте при 20 ° C. Наблюдайте за образованием пигмента.

3. Подготовьте субкультуры из любых подозрительных наростов на всех обычных средах, тщательно изучите и исследуйте их патогенность.

8. Micrococcus Melitensis.—Молоко животного, инфицированного *M. melitensis*, обычно содержит эти организмы в большом количестве и лишь небольшое количество других бактерий.

1. Нанесите несколько наборов поверхностных пластин на нутрозный агар, каждую из одной петли осадка в пробирке D¹ или D².

2. Нанесите несколько наборов поверхностных пластин на нутрозный агар, на каждую из которых по одной капле исходного образца молока.

3. Инкубируйте аэробно при 37 ° C и проверяйте ежедневно до конца десяти дней.

4. Отделите подозрительные колонии, исследуйте их под микроскопом и субкультивируйте на нутрозном агаре в пробирках; на глюкозном агаре и в лакмусовом молоке.

5. Протестируйте последующий рост против сыворотки экспериментального животного, инокулированного против *M. melitensis*, чтобы определить его агглютинируемость.

6. Если очевидно, что *M. melitensis*, привейте рост из культуры на агаре нутрозы после трехдневной инкубации внутричерепно морской свинке.

МОРОЖЕНОЕ.

Сбор образца.—

1. Извлеките пробу из барабана половником или ложкой, которыми продавец продает мороженое, и сразу же поместите ее в стерильную медную капсулу, аналогичную той, которая используется для образцов земли (*смотрите* стр. 471).

2. Упакуйте для транспортировки в морозильную камеру.

3. По прибытии в лабораторию поместите медные капсулы с мороженым в инкубатор при температуре 20 ° C на пятнадцать минут — то есть до тех пор, пока хотя бы часть мороженого не станет жидкой.

Качественное и количественное обследование.—Обработайте жидкое мороженое как молоко и проведите проверку точно так же, как описано для молока (*видео* на странице 443).

ПРОВЕРКА СЛИВОК И СЛИВОЧНОГО МАСЛА.

Отбор образца.— Собирайте, храните и передавайте образцы в лабораторию точно так же, как это делается в случае с мороженым.

Количественный.—

Требуемое оборудование:

Стерильная пробирка.

Стерилизованный шпатель.

Водяная баня регулируется при температуре 42 ° С.

Комплект стерильных тарелок.

Коробка стерильных градуированных пипеток, 1 куб.см (в сотых долях).

Пробирки с желатин-агаром (реакция+10).

Подставка для выравнивания тарелок с водяной камерой, заполненной водой при температуре 42 °С.

Способ.—

1. Перенесите несколько граммов образца в стерильную пробирку с помощью стерилизованного шпателя.

2. Поместите пробирку на водяную баню при температуре 42 ° С, пока содержимое не станет жидким.

3. Расплавьте восемь тюбиков желатинового агара и поместите их на водяную баню при температуре 42 ° С и остудите до этой температуры.

4. Засыпьте в пробирки с желатин-агаром следующие количества образца с помощью стерильной пипетки, отмеренной с точностью до сотых долей кубического сантиметра, а именно:

В трубочку № 1 добавьте 1 ст. ложку разжиженного сливочного масла.

2 добавьте 0,5 ст. ложки разжиженного сливочного масла.

3 добавьте 0,3 стакана разжиженного сливочного масла.

4 добавьте 0,2 стакана разжиженного сливочного масла.

5 добавьте 0,1 стакана разжиженного сливочного масла.

6 добавьте 0,05 стакана разжиженного сливочного масла.

7 добавьте 0,03 стакана разжиженного сливочного масла.

8 добавьте 0,02 стакана разжиженного сливочного масла.

9 добавьте 0,01 стакана разжиженного сливочного масла.

5. Разлейте по чашкам для культивирования из каждой пробирки с желатиновым агаром и инкубируйте при 28°С.

6. "Подсчитайте" чашки после трехдневной инкубации и по полученным таким образом цифрам оцените количество присутствующих организмов на кубический сантиметр образца.

Качественный.—

Требуемое оборудование:

Стерильный стакан, горлышко которого заткнуто стерильной ватой.

Подставка для мензурки.

Весы и гири.

Стерилизованная лопатка.

Водяная баня регулируется при температуре 42 ° С.

Разделительная воронка, вместимость 250 °с, нагнетательная трубка защищена от загрязнения путем пропускания ее через ватную пробку внутрь небольшой колбы Эрленмейера, которая служит опорой для воронки. Этот прибор стерилизуется *в массовом порядке* в духовке с горячим воздухом.

Большая центробежная машина.

Стерильные пробирки (для центрифуги) закрываются прочными резиновыми пробками.

Коробка стерильных пипеток, 10 мл.

Коробка стерильных градуированных пипеток, 1 куб.см (в десятых долях кубического сантиметра).

Способ.—

1. Взвесьте 100 граммов образца в стерильном стакане.
 2. Заткните горловину мензурки стерильной ватой и погрузите мензурку на водяную баню при температуре 42 ° С до полного растворения содержимого.
 3. Перелейте разжиженное сливочное масло в стерильную разделительную воронку.
 4. Перенесите воронку в инкубатор при температуре 37 °С и оставьте там на четыре дня.
- По истечении этого времени содержимое воронки разделится на два отдельных слоя.
- (а) поверхностный маслянистый слой, практически свободный от бактерий.
- (б) глубокий водяной слой, мутный из-за размножения бактерий.
5. Удалите тонкий мутный слой в стерильные центробежные пробирки, предварительно нагрейте примерно до 42 ° С и сразу же центрифугируйте.
 6. Отцедите пипеткой надосадочную жидкость и заполните пробирки 1%-ным стерильным раствором. раствор карбоната натрия предварительно слегка подогрейте; закупорьте пробирки и энергично встряхивайте в течение нескольких минут.
 7. Снова центрифугируйте.
 8. Удалите надосадочную жидкость пипеткой; наполните пробирки теплым стерильным бульоном, хорошо встряхните и снова центрифугируйте, чтобы смыть осадок.
 9. Отцеживайте пипеткой надосадочную жидкость.
 10. Приготовьте покровные препараты, закрепите и очистите, как для молочных препаратов, окрасьте карболовым метиленовым синим по методу Грамма, Циля-Нельсена и исследуйте под микроскопом с помощью иммерсионной линзы диаметром 1/12 дюйма.
 11. Продолжайте осмотр отложений, как в случае с отложениями молока (см. стр. 450 и далее.).

ЭКСПЕРТИЗА НЕКАЧЕСТВЕННОГО МЯСА.

(Включая мясные консервы, рыбу и т.д.)

Бактериоскопическое исследование недоброкачественных пищевых продуктов в основном направлено на выявление тех представителей группы кишечных палочек и брюшного тифа - *B. enteritidis* Гертнера и его союзников, — которые обычно ассоциируются с эпидемическими вспышками пищевых отравлений, а также таких анаэробных бактерий, которые инициируют гнилостные изменения в пищевых продуктах, приводящие к образованию ядовитых птомаинов, следовательно, количественное исследование в чистом виде часто пропускается.

А. Культурная экспертиза.

Количественный.—

Требуемое оборудование:

Стерилизованный консервный нож (при необходимости).

Колба Эрленмейера (емкостью 500 гр.), содержащая 200 гр. стерильного бульона, снабжена прочной резиновой пробкой.

Противовес.

Ножницы и щипцы.

Весы и гири.

Стерилизатор для воды.

Шприц для подкожных инъекций.

Шприц с внутрижелудочным зондом.

Крысиные щипцы.

Коробка со стерильными капсулами.

Фильтрующий аппарат для анализа воды.

Ящик со стерильными тарелками.

Коробка стерильных градуированных пипеток, 10 °с (в десятых долях кубического сантиметра).

Коробка стерильных градуированных пипеток, 1 куб.см (в десятых долях кубического сантиметра).

Подставка для выравнивания плит.

Тюбики с питательным желатином.

Пробирки с питательным агаром.

Водяная баня регулируется при температуре 42 ° С.

Аппарат Буллоха.

Способ.—

1. Поставьте колбу со стерильным бульоном на 200°с на одну из чаш весов и аккуратно уравновесьте.
2. Измельчите часть образца с помощью стерильных ножниц и щипцов и добавьте измельченный образец в бульон в колбе в количестве 20 граммов.
3. Приготовьте экстракт, выдержав колбу в инкубаторе, работающем при температуре 42 ° С (или на водяной бане, отрегулированной до этой температуры) в течение получаса, время от времени встряхивая ее содержимое. Лучшие результаты достигаются, если внутри инкубатора установлен электрический шейкер и колба находится в движении в течение всех тридцати минут.

Теперь каждый сантиметр содержит бактерии, вымытые из 0,1 грамма исходной пищи.

4. Наполните пробирки сжиженным желатином следующим образом:

В пробирку № 1 добавьте 1,0 ч.л. экстракта.

2 добавьте 0,5 ч.л. экстракта.

3 добавьте 0,3 ч.л. экстракта.

4 добавьте 0,2 ч.л. экстракта.

5 добавьте 0,1 ч.л. экстракта.

Разлейте по чашкам из этих пробирок и инкубируйте при 20° С.

5. Подготовьте точно такой же набор чашек с агаром и инкубируйте при 37°С.

6. Перелейте пипеткой 5 мл экстракта в стерильную пробирку, нагрейте в дифференциальном стерилизаторе при температуре 80 ° С в течение десяти минут.

7. Из нагретого экстракта готовят дублирующие наборы агаровых и желатиновых пластинок и анаэробно инкубируют в аппарате Буллоха при 37°С и 20°С соответственно.

8. После трехдневной инкубации исследуйте чашки с агаром, как аэробным, так и анаэробным, и подсчитайте колонии, развившиеся из спор (7), а также из вегетативных форм и спор (5), и рассчитайте и запишите количество каждой группы на грамм исходного корма.

9. После семидневной инкубации (или раньше, если это вызвано ростом разжижающихся колоний) пересчитайте желатиновые пластинки таким же образом.

10. Проведите субкультуру из появившихся колоний и идентифицируйте различные организмы.

11. Продолжайте исследования в отношении обнаружения патогенных организмов, как описано под водой (стр. 429 и далее.).

Качественный.—

I. Культурный.

Микроорганизмы, обнаруживаемые при исследовании некачественных пищевых продуктов, включают следующие:

Представители групп кишечной палочки и брюшного тифа (в основном представители класса Гертнера).

B. anthracis.

Стрептококки

Анаэробные бактерии:

B. enteritidis sporogenes.

B. botulinus.

B. cadaveris.

Методы, с помощью которых эти организмы, если они присутствуют, могут быть идентифицированы и выделены, уже были описаны в соответствующем разделе исследования воды, за исключением тех, которые применимы к *B. botulinus* и *B. cadaveris*. Они могут быть удовлетворительно выделены только из тел экспериментально привитых животных.

II Экспериментальный.

Ткань.—

1. Кормите крыс и мышей порциями образца и наблюдайте за результатом.
2. Если какое-либо из животных умрет, проведите полное посмертное обследование и постарайтесь изолировать патогенные организмы.

Выдержка.—

1. Вводите различные количества бульонного экстракта в желудки нескольким крысам, мышам и морским свинкам повторно в течение двух-трех дней методом внутрижелудочной инокуляции (см. стр. 367) и наблюдайте за результатом. Морские свинки и мыши очень восприимчивы к заражению *B. botulinus* этим методом; кролики в меньшей степени.
2. Привейте крысам, мышам и морским свинкам подкожно в глубокие карманы и внутрибрюшинно различные количества бульонного экстракта и понаблюдайте за результатом.
3. Отфильтруйте часть экстракта через свечу Чемберленда и инкубируйте фильтрат для определения присутствия растворимых токсинов.
4. Если какое-либо из животных погибнет от любого из этих методов прививки, проведите тщательное посмертное обследование и постарайтесь изолировать патогенные организмы.

ИЗУЧЕНИЕ УСТРИЦ И ДРУГИХ МОЛЛЮСКОВ.

При вскрытии раковины устрицы обнаруживается определенное количество жидкости, называемой "ликером". Ее количество варьируется от капли до многих кубических сантиметров (от 0,1 до 10 ° c). В последнем случае основная масса жидкости, вероятно, является последним

количеством воды, проглоченным двустворчатым моллюском перед закрытием его раковины. Чтобы получить рабочее среднее значение бактериологической флоры образца, следует взять десять устриц, а перед исследованием тщательно перемешать тело, желудочный сок и ликер. Обследование, как и при работе с другими продуктами питания, направлено на поиск представителей группы кишечных палочек и брюшного тифа, стрептококков сточных вод и, возможно, также *B. enteritidis sporogenes*.

Требуемое оборудование:

Две жесткие кисточки для ногтей.

Жидкое мыло.

Стерильная вода в банке-аспираторе с насадкой для подачи, регулируемой пружинным зажимом.

Стерильные ножи для устриц.

Стерильное стеклянное блюдо с крышкой, достаточно большое, чтобы вместить десять устриц.

Стерильные щипцы.

Стерильные ножницы.

Стерильные полотенца или большие марлевые подушечки.

Стерильные градуированные цилиндры емкостью 1000 °с с крышкой или дном стерильной чашки Петри, перевернутой над открытым горлышком в качестве крышки.

Стеклянные стержни.

Едкий сублиматный раствор, 1 промилле.

Трубочки для бульона с желчной солью.

Лакмусовые трубочки для молока.

Поверхность пластинок покрыта нутрозным агаром.

Коробка стерильных пипеток, 1 ст.л. (в десятых долях ст.л.)

Коробка стерильных пипеток, 10°с (в десятых долях градуса)

Упаковка стерильных стеклянных капсул.

Колбы Эрленмейера, вместимостью 250 °с.

Бульон с желчной солью двойной крепости.

Способ.—

1. Тщательно очистите раковины устриц снаружи, протирая каждую по очереди жидким мылом и щеточкой для ногтей под струей проточной воды. Затем, взяв раковину устрицы стерильными щипцами, промойте каждую часть внешней стороны раковины струей стерильной воды,

текущей из банки-аспиратора; положите устрицу в стерильную стеклянную посуду. Повторите этот процесс с каждой из оставшихся устриц.

2. Прежде чем продолжить, тщательно вымойте руки чистой щеткой для ногтей, мылом и водой, затем окуните их в 2%-ный раствор лизола. раствор, и, наконец, в стерильной воде.

3. Расстелите на скамейке стерильное полотенце.

4. Достаньте одну из устриц из стерильной стеклянной посуды и положите ее выпуклой раковиной на полотенце. Заверните уголок стерильного полотенца поверх верхней плоской скорлупы, чтобы левая рука, удерживающая скорлупу, была более крепкой.

5. Стерильным устричным ножом (в правой руке) вскройте раковину и отделите тело устрицы от внутренней поверхности верхней плоской раковины. Отогните и отделите плоскую раковину, оставив тело устрицы внутри и прикрепленным к вогнутой раковине. Старайтесь не проливать ликер.

(Перед проведением этих экспериментов следует научиться открывать устрицы).

6. Разрежьте тело устрицы стерильными ножницами на небольшие кусочки и дайте ликеру, выделившемуся из тела в процессе, смешаться с ликером, предварительно вынутым из раковины.

7. Переложите измельченные устрицы и ликер в форму.

8. Обработайте каждую из оставшихся устриц аналогичным образом.

9. Тщательно перемешайте содержимое баллона стерильной стеклянной палочкой. Общий объем составит около 100 мл.

10. Используйте 0,1 стакана смешанного раствора для оплодотворения каждой из серии из трех поверхностных пластинок нутрозы.

11. Инокулируйте по 0,1 стакана смешанного раствора в каждую из трех пробирок с лакмусовой бумажкой.

12. Добавьте стерильную дистиллированную воду к содержимому баллона температурой до 1000 °с, тщательно перемешайте стерильной стеклянной палочкой и дайте отстояться. Содержание бактерий в каждой устрице для всех практических целей можно рассматривать как содержащееся в 100 г жидкости.

13. Разложите четыре стеклянные капсулы в ряд и пронумеруйте I, II, III, IV. Наберите в каждую пипетку по 9 мл стерильной дистиллированной воды.

14. В капсулу № I добавляю 1 ч.л. разбавленного ликера и т.д. из баллона и тщательно перемешиваю. К капсуле II добавьте 1 ч.л. раствора, содержащегося в капсуле I, и тщательно перемешайте. Перенесите 1 ч.л. жидкости из капсулы II в капсулу III, затем добавьте 1 ч.л. жидкости из капсулы III в капсулу IV.

15. Наклейте этикетки на пробирки с бульоном из желчных солей и внесите в них следующее количество разведенных устриц:

№ 6 с 10 каплями жидкости в цилиндре = 0,1 г устрицы.

№ 5 с 1 каплей жидкости в цилиндре = 0,01 г устрицы.

№ 4 с 1 каплей жидкости в капсуле I = 0,001 г устрицы.

№ 3 с 1 каплей жидкости в капсуле II = 0,0001 г устрицы.

№ 2 с 1 каплей жидкости в капсуле III = 0,00001 г устрицы.

№ 1 с 1 каплей жидкости в капсуле IV = 0,000001 г устрицы.

16. Перелейте 100-градусную жидкость для баллонов (= 1 устрице) в колбу Эрленмейера и добавьте 50-градусный бульон с желчной солью двойной крепости и маркировку 7.

17. Продублируйте все указанные выше культуры.

18. Поместите пробирные культуры в пробирки Бюхнера и инкубируйте анаэробно при 42 °С.

Если рост происходит в пробирке 1, то окончательно выделенный организм, *например*, *B. coli*, должен присутствовать в количестве одного миллиона на устрицу.

19. Завершите обследование на наличие представителей группы кишечной палочки, брюшного тифа и стрептококков сточных вод, как указано в разделе "Исследование воды", стр. 429 (шаги 11-21).

20. Инокулируйте серию из 6 пробирок лакмусовым молочком в количествах, аналогичных указанным на этапе 15; нагрейте до 80 °С в течение десяти минут и инкубируйте в анаэробных условиях при 37 °С. Проверьте на наличие *B. enteritidis sporogenes*, как указано в разделе "Исследование воды", стр. 438 (этапы 7-10).

ЭКСПЕРТИЗА СТОЧНЫХ ВОД И КАНАЛИЗАЦИОННЫХ СТОКОВ.

Количественный.—

Сбор образца.—Поскольку требуется только небольшое количество материала, пробы следует отбирать способом, аналогичным описанному, под водой для количественного исследования и передавать в аппарате для льда, используемом при упаковке этих проб.

Требуется аппарат.—Что касается воды (*видео*, стр. 420).

Способ.—

1. Разложите четыре стерильные капсулы в ряд и пронумеруйте их I, II, III, IV.

2. Перелейте пипеткой 9 ст.л. стерильного бульона в капсулу № I.

3. Разлейте пипеткой 9,9 стакана стерильного бульона по капсулам II, III и IV.

4. Добавьте 1 ч.л. сточных вод в капсулу № I с помощью стерильной пипетки и тщательно перемешайте.

5. Возьмите свежую стерильную пипетку и перенесите 0,1 стакана смеси из № I в № II и тщательно перемешайте.

6. Аналогичным образом перенесите 0,1 у.е. с № II на № III, а затем 0,1 у.е. с № III по IV.

Теперь 1 ч.л. разведения № I содержит 0,1 с.с. исходных сточных вод.
1 с.с. разбавителя № II содержит 0,001 у.е. исходных сточных вод.
1 у.е. разбавления № III содержит 0,00001 у.е. исходных сточных вод.
1 у.е. разбавления № IV содержит 0,0000001 с.с. исходных сточных вод.

7. Налейте набор желатиновых пластинок из содержимого каждой капсулы, по три пластинки в наборе, содержащих соответственно 0,2, 0,3 и 0,5 ч.л. раствора. Тщательно маркируйте; инкубируйте при 20 ° С в течение трех, четырех или пяти дней.

8. Перечислите организмы, присутствующие в тех наборах тарелок, которые не превратились в жидкость, вероятно, из разбавления III или IV, и рассчитайте исходя из этого их количество на кубический сантиметр исходной пробы сточных вод.

Качественный.—Качественное исследование сточных вод связано с идентификацией и подсчетом тех же бактерий, что рассматриваются в соответствующем разделе исследования воды; следовательно, оно проводится по методикам, в точности аналогичным уже указанным (смотрите страницы с 426 по 441).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА.

Количественный.—

Требуемое оборудование:

Флакон-аспиратор емкостью 10 литров, снабжен нагнетательной трубкой, горловина которой закрыта перфорированной резиновой пробкой, через которую проходит короткая стеклянная трубка.

Колба Эрленмейера, вместимостью 250°с (с широким горлышком, плотно заткнутым ватой), содержит 50°с стерильной воды.

Резиновая пробка для установки в горловину колбы, перфорированная с двумя отверстиями и установленная следующим образом:

Возьмите стеклянную трубку длиной 9 см и загните один конец на 3 см вверх под прямым углом к основной длине трубки. Проденьте длинную часть уголка через одно из отверстий в пробке; открытый конец короткой части уголка заткните ватой.

Возьмите стеклянную воронку диаметром 5 или 6 см с ножкой длиной 12 см и согните ножку вплотную к вершине воронки по плавному изгибу в четверть круга; проденьте длинную ножку через другое отверстие в резиновой пробке.

Банку-аккумулятор или небольшую водяную баню для хранения фляжки Эрленмейера, заполненной льдом.

Запас битого льда.

Резиновая трубка.

Винтовые зажимы и пружинные зажимы для труб.

Стерилизатор для воды.

Подставка для реторт и зажимы.

Устройство для нанесения покрытия (что касается подсчета водных организмов, *смотрите* стр. 420).

Способ.—

1. Налейте 10 литров воды во флакон для аспирации и прикрепите кусок резиновой трубки с винтовым зажимом к нагнетательной трубке. Полностью откройте краны и экспериментальным путем отрегулируйте винтовой зажим таким образом, чтобы в трубу каждую секунду подавался 1 куб. см воды. Во время эксперимента к винтовому зажиму больше не прикасаются.

При такой скорости флакон с аспиратором опорожнится сам собой менее чем за три часа. Перекройте кран и снова долейте содержимое баллона с аспиратором до 10 литров.

2. Простерилизуйте установленную резиновую пробку с воронкой и трубкой, прокипятив в водном стерилизаторе в течение десяти минут.

3. Снимите с колбы пробку из ваты и замените ее резиновой пробкой с фитингами. Убедитесь, что конец ножки воронки погружен в бульон.

4. Поместите фляжку в стеклянный или металлический сосуд и насыпьте в него толченый лед. Расположите колбу со льдом так, чтобы она находилась чуть выше горлышка флакона-аспиратора.

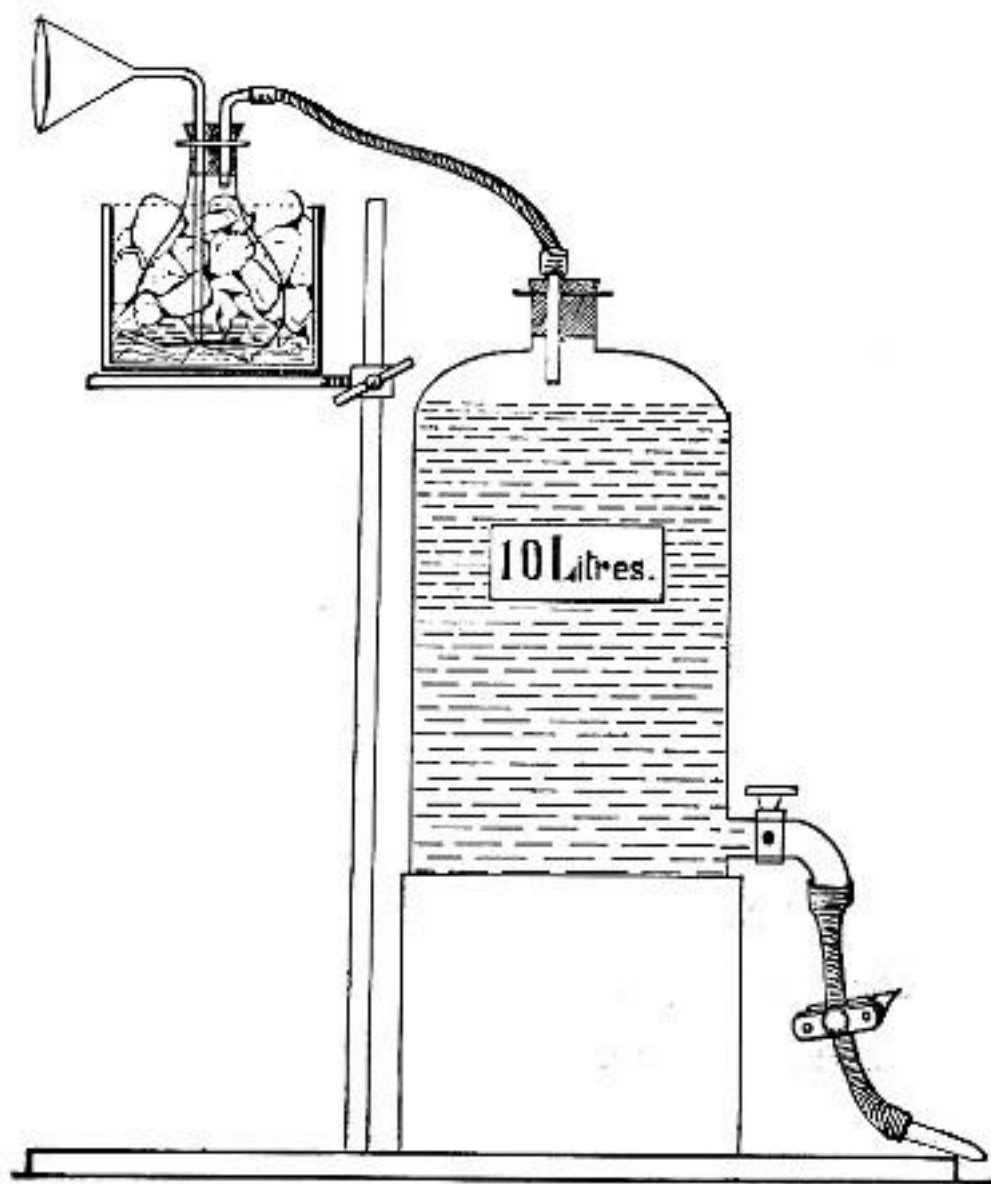


Рис. 216. Устройство

аппарата для анализа воздуха.

5. Соедините свободный конец стеклянной трубки из колбы — предварительно сняв пробку из ваты - с воздухозаборником в горловине аспирационного флакона (рис. 216).

6. Полностью откройте кран и дайте воде стечь.

При необходимости время от времени пополняйте запасы льда.

(При опорожнении баллона-асpirатора через воду в колбе Эрленмейера медленно всасывается 10 литров воздуха.)

7. По завершении аспирации отсоедините колбу и извлеките ее из упаковки со льдом.

8. Разжижите три пробирки питательного желатина и добавьте в них 0,5 стакана, 0,3 стакана и 0,2 стакана воды из колбы, соответственно, с помощью стерильной градуированной пипетки, как при количественном анализе воды. Разлейте по тарелкам.

9. Налейте второй такой же набор желатиновых пластинок.

10. Инкубируйте оба набора пластин при 20°C.

11. Подсчитайте колонии, присутствующие в двух наборах желатиновых пластинок, через три, четыре или пять дней и усредните полученные таким образом результаты; оцените количество микроорганизмов, присутствующих в 1 стакане, а затем в 50 стаканах бульона в колбе.

12. Результат исследования воздуха обычно выражается как количество бактерий, присутствующих на кубический метр (*т.е.* килолитр) воздуха; а поскольку количество организмов, присутствующих в воде при температуре 50 °с, соответствует только тем, которые содержатся в 10 литрах воздуха, полученную цифру необходимо умножить на 100.

Качественный.—

1. Действуйте точно так же, как при количественном исследовании воздуха (*видео выше*), шаги 1-10.

2. Залейте чашки с сусловым агаром таким же количеством воды, загрязненной воздухом, и выдерживайте при 37°C.

3. Залейте чашки с питательным агаром таким же количеством воды и инкубируйте при 37°C.

4. Залейте аналогичными пластинами желатиновое сусло и выдержите при 20°C.

5. Выберите отдельные колонии, которые появляются на нескольких чашках, повторно культивируйте их на различных средах и идентифицируйте.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ.

Бактериологическое исследование почвы дает информацию, ценную для санитарного врача в ходе процесса гомогенизации "готовой почвы" (*например*, свалка городских отходов) и определяет период, в течение которого такая территория может быть надлежащим образом и безопасно использована для строительных целей; или для агронома при информировании его о пригодности той или иной территории для выращивания сельскохозяйственных культур.

Поверхность земли, подверженная бактерицидному воздействию солнечного света и быстрой смене жары и холода, дождя и ветра, содержит лишь небольшое количество микроорганизмов. Опять же, из-за плотности молекул глубокой почвы и отсутствия аэрации, с одной стороны, и фильтрующего действия верхних слоев почвы и бактериального антагонизма, с другой, бактериальная жизнь практически прекращается на глубине около 2 метров. Промежуточный слой почвы, расположенный на глубине от 25 до 50 см ниже поверхности, неизменно дает наиболее многочисленную и разнообразную бактериальную флору.

Сбор образца.— Маленькая медная капсула 6 см. высокое, диаметром 6 см, со съемной крышкой, закрепленной штыковой защелкой, предварительно стерилизованное в печи с горячим воздухом, является наиболее удобным вместилищем для образцов почвы.

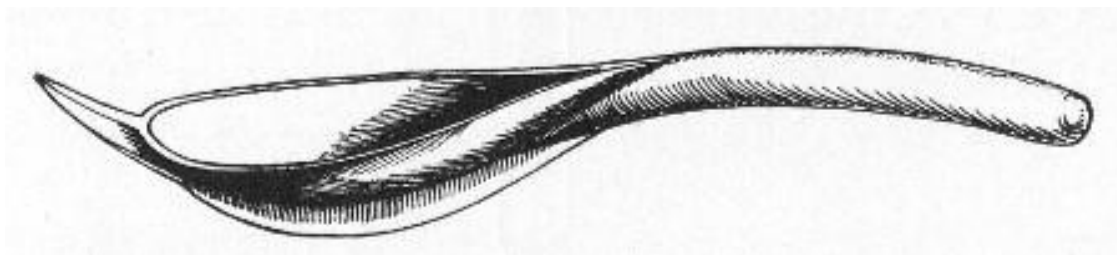


Рис. 217.Совок для

сбора почвы.

Инструмент, используемый для фактического извлечения почвы из ее естественного положения, будет варьироваться в зависимости от того, требуются ли нам образцы с поверхности или с разной глубины.

(а) Для **поверхностных** образцов используйте железный совок, по форме напоминающий рожок для обуви, но снабженный острым выступом (рис. 217). Это заворачивают в асбестовую ткань и стерилизуют в духовке с горячим воздухом. Вынимая из духовки, оберните асбестовую ткань куском промасленной бумаги, шелка или гуттаперчевого полотна и закрепите бечевкой в качестве дополнительной защиты от загрязнения.

По достижении места, откуда должны быть взяты пробы, крышки совка снимаются, и используется асбестовая ткань для удаления сыпучих камней и обломков с выбранного участка. Затем поверхностный грунт разбивают кончиком совка, соскребают и собирают в корпус совка и переносят в стерильную капсулу для передачи.

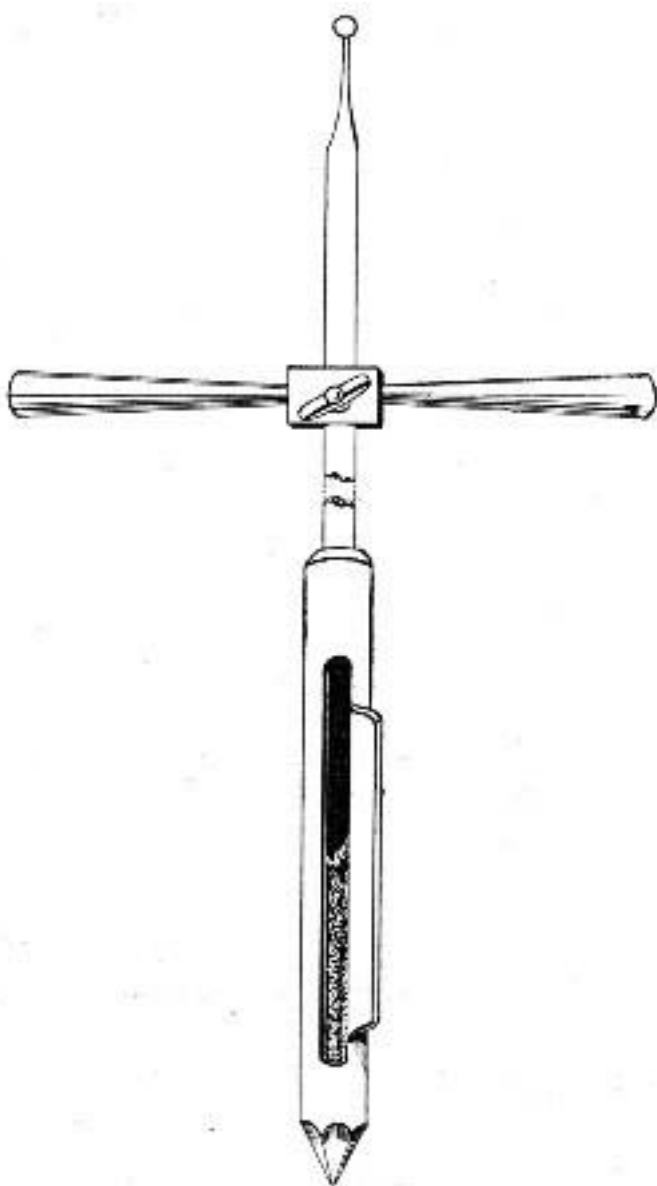


Fig. 218.—Fraenkel's borer.

(b) Для **глубоких** проб, взятых на различных расстояниях от поверхности, может быть прорезана экспериментальная траншея требуемой глубины и взяты пробы в требуемых точках на поверхности разреза. Однако предпочтительнее использовать сверло какой-либо формы, например, разработанное Френкелем (рис. 218).

Землеройный станок Френкеля.—Этот инструмент состоит из прочного стержня из твердой стали длиной 150 см, отмеченного в сантиметрах от заостренного конца. Он снабжен поперечной ручкой (регулируется в любой точке по длине стержня с помощью винтовой гайки). Концевые сантиметры толще, чем остальная часть стержня, и с одной стороны вырезается вертикальное углубление глубиной около 0,5 см. Она закрывается фланцевой втулкой до тех пор, пока бур погружается в почву по часовой стрелке, и открывается для взятия образца почвы, когда достигается требуемая глубина, путем обратного завинчивания, и снова закрывается перед извлечением бура из земли путем возобновления первоначального направления закручивания. Его можно стерилизовать способом, аналогичным тому, который используется для совка, или путем многократного заполнения полости эфиром и выжигания.

Количественный.—В полное количественное бактериологическое исследование почвы включены четыре отдельных исследования:

1. Перечисление аэробных организмов.
2. Перечисление спор аэробов.
3. Перечисление анаэробных организмов (включая факультативные анаэробы).
4. Перечисление спор анаэробов.

Далее, путем объединения результатов первого и второго, а также третьего и четвертого из них получают соотношение спор к вегетативным формам.

Требуемое оборудование:

Упаковка стерильных капсул (емкостью 25 куб.см).

Коробка стерильных градуированных пипеток, 10 °с (в десятых долях кубического сантиметра).

Коробка стерильных градуированных пипеток, 1 куб.см (в десятых долях кубического сантиметра).

Колба, содержащая 250 мл стерильного бульона.

Высокий цилиндр, содержащий 2%-ный раствор. раствор лизола.

Подставка для выравнивания плит.

12 стерильных тарелок.

Тюбики с питательным желатином.

Трубочки из желатинового сула.

Пробирки с питательным агаром.

Тюбики с глюкозоформинат-желатином.

Пробирки с глюкозоформинатным агаром.

Водяная баня регулируется при температуре 42 ° С.

Горелка Бунзена.

Жирный карандаш.

Стерильная ступка и пестик (агатный).

Стерильная колба Эрленмейера с широким горлышком (емкость 500 °с).

Стерильная металлическая воронка с короткой подающей трубкой с широким отверстием, чтобы она точно подходила к горловине колбы.

Колбу закрывают прочной резиновой пробкой (стерилизуют кипячением).

Пара весов.

Противовес (рис. 107).

Стерильная металлическая (никелевая) ложка или лопаточка.

Дробный стерилизатор (рис. 140).

Способ.—

1. Разложите четыре стерильные капсулы с номерами I, II, III и IV; в первую капсулу насыпьте пипеткой 9 ст. л. стерильного бульона, а в каждую из трех оставшихся - 9,9 ст.л. воды.

2. Перелейте пипеткой 100-градусный стерильный бульон в колбу Эрленмейера.

3. Выньте ватную пробку из колбы и замените ее стерильной воронкой.

4. Поставьте колбу и воронку на одну чашу весов и аккуратно уравновесьте.

5. Высыпьте образец почвы в ступку и тщательно разотрите.

6. С помощью стерильной лопаточки добавьте 10 граммов образца земли в бульон в колбе.

Окончательные результаты будут более надежными, если шаги 2, 3, 4 и 5 выполнять под колпаком — для защиты от попадания пыли и т.д.

7. Выньте воронку из горловины колбы; закройте ее резиновой пробкой и энергично встряхните; затем дайте твердым частицам осесть в течение примерно тридцати минут. Один кубический сантиметр мутного бульона содержит смывы 0,1 грамма почвы.

8. Отцедите пипеткой 1 ч.л. надосадочного бульона, называемого "почвенной водой", и добавьте его к содержимому капсулы I; тщательно перемешайте.

9. Удалите 0,1 стакана зараженного бульона из капсулы I, добавьте его в капсулу II и перемешайте.

10. Аналогичным образом добавьте 0,1 ч.л. содержимого капсулы II к капсуле III, а затем 0,1 ч.л. содержимого капсулы III к капсуле IV.

Затем 1 куб. см жидкости из капсулы I содержит почвенную воду из 0,01 г земли.

Затем 1 куб. см жидкости из капсулы II содержит почвенную воду из 0,0001 г земли.

Затем 1 куб. см жидкости из капсулы III содержит почвенную воду из 0,000001 г земли.

Затем 1 куб. см жидкости из капсулы IV содержит почвенную воду из 0,00000001 г земли.

А) Аэробные организмы (вегетативные формы и споры).—

11. Налейте набор желатиновых пластинок из содержимого каждой капсулы — по две пластинки в наборе, содержащие соответственно 0,1 и 0,4 стакана разбавленной почвенной воды. Маркируйте и инкубируйте.

12. Содержимое капсул II и III залейте аналогичными наборами желатиновых пластинок для приготовления сусла, наклейте этикетки и выдержите при 20°C.

13. Содержимое капсул II и III залейте аналогичными наборами агаровых пластинок; маркируйте и инкубируйте при 37°C.

14. Взвесьте второй образец почвы — 10 граммов — высушите на водяной бане до получения постоянного веса и рассчитайте соотношение

масса влажной почвы

масса сухой почвы

15. "Подсчитайте" пластины после инкубации в течение трех, четырех или пяти дней и скорректируйте полученные таким образом цифры с помощью оценки соотношения "влажной" и "сухой" почвы —

(а) количество аэробных микроорганизмов, присутствующих на грамм почвы.

(b) количество дрожжей и плесневых грибов на грамм почвы.

(с) количество аэробных организмов, "растущих при 37°C", присутствующих на грамм почвы.

(В) *Анаэробы (вегетативные формы и споры).*—

16. Налейте аналогичные наборы тарелок в глюкозоформинатный желатин и агар и инкубируйте в анаэробном аппарате Буллоха.

С) *аэробные и анаэробы (только споры).*—

17. Наберите пипеткой 5 мл почвенной воды в стерильную пробирку.

18. Поместите в дифференциальный стерилизатор при температуре 80° С на десять минут.

19. Налейте два набора из четырех желатиновых пластинок, содержащих 0,1, 0,2, 0,5 и 1 ч.Л. почвенной воды соответственно; маркируйте и инкубируйте при 20 ° С, одну готовьте аэробно, другую анаэробно в аппарате Буллоха.

20. "Подсчитайте" таблички (отложите подсчет как можно дольше) и оцените количество спор аэробов и анаэробов соответственно на грамм почвы.

21. Рассчитайте соотношение, существующее между спорами и спорами + вегетативные формы для каждой из двух групп, аэробных и анаэробных микроорганизмов.

Качественная экспертиза.—Качественная экспертиза почвы обычно направлена на выявление одного или нескольких из следующих признаков:

Представители группы кишечных палочек и брюшного тифа.

Стрептококки.

Антрацитовая палочка.

Бацилла столбняка.

Bacillus oedematis maligni.

Азотистые организмы.

Азотсодержащие организмы.

1. Перелейте остаток почвенной воды (88 °C) в стерильную колбу Эрленмейера с помощью стерильного сифона.
2. Установите фильтрующее устройство для качественного анализа воды и отфильтруйте почвенную воду.
3. Растворите остатки бактерий в 5-градусном стерильном бульоне (метод аналогичен описанному для образца воды, *видео* на страницах 434-436).

Каждый кубический сантиметр взвеси теперь содержит почвенную воду из почти 1 грамма земли.

Методы до этого момента идентичны независимо от того, какой организм или группу организмов желательно изолировать; но начиная с этой стадии процесс немного отличается для каждой конкретной бактерии.

I. Группа кишечной палочки и брюшного тифа.-

II. Стрептококки.—

III. Антрацитовая палочка.—

IV. Бацилла столбняка.—

Методы, принятые для выделения этих организмов, идентичны методам, уже описанным под водой (стр. 437 и далее.).

V. *Bacillus Oedematis Maligni*.—Метод, в точности аналогичный тому, который применялся для *B. tetani*.

VI. Азотистые организмы.—

1. Возьмите десять пробирок с раствором Виноградского № I (*видео*, стр. 198) и пронумеруйте их последовательно от 1 до 10.
2. Инокулируйте каждую пробирку различным количеством материала следующим образом:

В пробирку № 1 добавьте 1,0 ч.л. почвенной воды.

В пробирку № 2 добавьте 0,1 ч.л. почвенной воды.

В пробирку № 3 добавьте 1,0 ч.л. из капсулы I.

В пробирку № 4 добавьте 0,1 ст.л. из капсулы I.

В пробирку № 5 добавьте 1,0 ст.л. из капсулы II.

В пробирку № 6 добавьте 0,1 ст.л. из капсулы II.

В пробирку № 7 добавьте 1,0 ст.л. из капсулы III.

В пробирку № 8 добавьте 0,1 ст.л. из капсулы III.

В пробирку № 9 добавьте 1,0 ст.л. из капсулы IV.

В пробирку № 10 добавить 0,1 ст.л. из капсулы внутривенно.

Маркируйте и инкубируйте при 30° С.

VII. Азотные организмы.—

3. Возьмите десять пробирок с раствором Виноградского № II, пронумеруйте их последовательно от 1 до 10 и инокулируйте количеством почвенной воды, аналогичным тем, которые перечислены в разделе VI, шаг 2. Маркируйте и инкубируйте при 30 ° С.

4. Провести исследование после двадцати четырех-сорока восьми часов инкубации. Из тех пробирок, в которых видны признаки роста, сделайте подкультивацию в свежих пробирках с той же средой и инкубируйте при 30° С.

5. Сделайте дальнейшие подкультуры из тех пробирок, в которых наблюдается рост, и снова инкубируйте.

6. Если в этих субкультурах наблюдается рост, нанесите поверхностные мазки на пластины с силикатным желе Виноградского (*видео*, стр. 198).

7. Отбирайте такие колонии, которые появляются, и культивируйте в каждой из этих двух сред.

ТЕСТИРОВАНИЕ ФИЛЬТРОВ.

Фарфоровые фильтрующие свечи проверяются на их способность задерживать *все* микроорганизмы, взвешенные в жидкостях, которые фильтруются через них, и пропускать только фильтраты, не содержащие микробов. Чтобы определить, нет ли в фильтре дефектов и трещин, которые могли бы способствовать проникновению бактерий, независимо от того, насколько совершенной может быть общая конструкция свечи, свечу сначала необходимо присоединить с помощью длинного отрезка напорной трубки к мощному насосу, такому как ножной велосипедный насос, оснащенный манометром. Затем свечу погружают в сосуд с водой и держат полностью погруженной, в то время как внутреннее давление постепенно повышается до двух атмосфер под действием насоса. Любая трещина или изъян сразу станут очевидны из-за потока пузырьков воздуха, выходящих из него.

Проверка на проницаемость проводится следующим образом:

Требуемое оборудование:

Фильтрующий аппарат: Используемая фильтрующая свеча должна соответствовать той, для проверки которой она предназначена, и должна быть предварительно тщательно стерилизована; устройство аппарата, естественно, будет отличаться в зависимости от типа фильтра, того или иного из уже описанных (*вид* страницы 42-48).

Подставка для выравнивания плит.

Ящик со стерильными тарелками.

Коробка стерильных пипеток, 10°с (в десятых долях).

Коробка стерильных пипеток, 1 куб.см (в десятых долях).

Тюбики с питательным желатином.

Колба, содержащая стерильный физиологический раствор.

Стерильная мерная колба емкостью 1000 °с.

Способ.—

1. Подготовьте поверхностное культивирование *Bacillus mycoides* на питательном агаре в бутылке для культивирования и инкубируйте при 20 ° С в течение сорока восьми часов.
2. Наберите пипеткой 5 мл стерильного физиологического раствора во флакон для культивирования и эмульгируйте в нем всю поверхность роста.
3. Перелейте эмульсию пипеткой в стерильную мерную колбу и разбавьте до 1000°с добавлением стерильной воды.
4. Перелейте эмульсию в емкость для фильтра и начните фильтрацию.
5. По завершении фильтрации налейте шесть чашек с агаром, каждая из которых содержит по 1 ч.л. фильтрата.
6. Инкубировать при температуре 37°С. до истечения, при необходимости, семи дней.
7. Если фильтрат не стерилен, субкультивируйте переданный организм и определите его идентичность с тестируемой бактерией, прежде чем выбрасывать фильтр, поскольку фильтрат мог быть случайно загрязнен.
8. Если фильтрат стерилен, повторно стерилизуйте свечу и повторите тест, заменив его культивированием *B. prodigiosus*—бациллы меньшего размера.
9. Если второй тест удовлетворительный, протестируйте свечу на культивирование очень маленького кокка, *например*, *Micrococcus melitensis*, аналогичным образом; в этом случае продолжайте инкубацию культивирования из фильтрата в течение четырнадцати дней.

ТЕСТИРОВАНИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ.

Методы уже были подробно описаны (стр. 310) с целью изучения жизнестойкости микроорганизмов к летальному действию бактерицидов. Но часто бывает так, что бактериологу приходится определять относительную эффективность "дезинфицирующих средств" скорее с точки зрения санитара и коммерсанта, чем с точки зрения научного работника. При проведении этого направления исследований удобно сравнить эффективность предлагаемого дезинфицирующего средства в лабораторных условиях с эффективностью некоторых стандартных бактерицидов, таких как чистый фенол. При этом и для того, чтобы можно было сравнивать работу разных наблюдателей, должны быть созданы условия, максимально приближенные к единообразным. Описанный метод использовался автором на протяжении многих лет, но недавно был изменен в связи с принятием некоторых рекомендаций Комиссии Lancet по стандартизации дезинфицирующих средств, в частности, в отношении расчета для определения фенольного коэффициента.

Этот метод имеет много общего с модификацией метода "сбрасывания", известной как тест Райдила-Уокера.

Общие соображения.—

Они могут быть сгруппированы по трем разделам: Тест на бактерии, Бактерициды и окружающая среда.

1. Тестируемый микроб.—*B. coli*.

Поскольку дезинфицирующие средства тестируются в санитарных целях, очевидно, что в качестве тестируемого микроба следует выбирать представителя группы кишечных палочек и брюшного тифа. *B. coli* выбрана из-за ее относительной непатогенности, легкости, с которой она может быть выделена и идентифицирована различными наблюдателями в различных частях мира, стабильности ее основных признаков и равномерности ее устойчивости при использовании для этих тестов; наконец, поскольку кишечная палочка является организмом, который несколько более устойчив к летальному действию бактерицидов, чем более патогенные представители этой группы, бактерии *B. coli* могут быть выделены и идентифицированы различными наблюдателями в различных частях мира. В тест вводится определенный запас прочности, что, безусловно, повышает его ценность.

B. coli следует недавно выделить из нормального стула и по крайней мере дважды обработать, чтобы гарантировать чистоту штамма; и подготовить исходную культуру на агаре, которую следует использовать во время любого конкретного теста. Для любого конкретного эксперимента готовят мазок культуры на агаре и инкубируют при 37°C в течение 24 часов в анаэробных условиях. Затем эмульгируют весь поверхностный рост в 10 градусах Цельсия стерильной воды. Перелейте эмульсию в стерильную пробирку с несколькими стерильными стеклянными шариками и тщательно встряхните, чтобы получить однородную эмульсию. Переложите эмульсию в центрифужную пробирку и центрифугируйте, чтобы удалить все скопления бактерий, которые, возможно, избежали дезинтегрирующего действия гранул. Отберите пипеткой надсадочную эмульсию для использования в тесте.

2. Бактерицидный препарат.—

а. Дезинфицирующее средство, подлежащее испытанию.—

Первым важным моментом является тестирование неизвестного дезинфицирующего средства, которое может обозначаться как гермицид-х, на линиях, приведенных на странице 311, для определения коэффициента его ингибирования.

После установления этой константы приготовьте различные растворы germicide-х на стерилизованной дистиллированной воде точными объемными методами, начиная с раствора, несколько более сильного, чем тот, который соответствует коэффициенту ингибирования. Растворы должны готовиться в достаточно большом количестве, не менее 5% от количества дезинфицирующего средства, используемого для приготовления любого данного процентного раствора.

б. Стандартный контроль.—Фенол.

Стандартным бактерицидом, используемым для сравнения, должен быть тот, химический состав которого не подвержен изменениям, и тот, который получил практически универсальное применение, - фенол.

В следующей таблице показано влияние различных процентных соотношений карболовой кислоты на *B. coli* при различном времени контакта, составленное на основе эксперимента, проведенного в стандартных условиях, указанных в разделе Окружающая среда. Результаты полностью соответствуют тем, которые были зарегистрированы Комиссией Ланцета по дезинфицирующим средствам в 1909 году.

Процент фенола времени контакта в течение нескольких минут.

	2-1/2	5	10	15	20	25	30	35
1.20	-	-	-	-	-	-	-	-
1.10	-	-	-	-	-	-	-	-
1.0	+	-	-	-	-	-	-	-
0.9	+	-	-	-	-	-	-	-
0.85	+	+	-	-	-	-	-	-
0.80	+	+	+	-	-	-	-	-
0.75	+	+	+	+	+	-	-	-
0.7	+	+	+	+	+	+	-	-
0.65	+	+	+	+	+	+	+	-

- = Отсутствие роста, т.е. бактерии убиты.

+ = Рост, т.е. все еще живые бактерии.

Из этого видно, что необходимо будет приготовить следующие процентные растворы, а именно: 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,75%, 0,7% в качестве контрольных для каждого эксперимента.

Приготовьте растворы различной процентной концентрации, взвесив необходимое для каждого количество карболовой кислоты и растворив в 100°с чистой дистиллированной воды в точно стандартизированной мерной колбе. Растворы должны готовиться свежими по мере необходимости каждый день.

Окружающая среда.—

а. Общие положения.—

Закройте окна и двери лаборатории, в которой проводится исследование, чтобы избежать сквозняков. Промойте рабочий стол и прилегающий пол раствором агрессивного сублимата в соотношении 1:1000. Предупредите помощника, если таковой нанят, чтобы он избегал ненужных движений или слов.

б. Температура контакта, 15-18°С.—

Это температура, при которой происходит контакт между бактерицидом и тестируемым микробом, и она имеет важное значение, поскольку некоторые бактерициды (например, фенол) оказываются более сильнодействующими при высоких температурах. 18 ° С — практически обычная комнатная температура — это температура, при которой размножение *B. coli* происходит сравнительно медленно, но изменение температуры на градус выше этой температуры или на два-три градуса ниже не имеет значения. Если во время проведения экспериментов температура в помещении ниже 15 ° С. Для приема пробирок со смесью

микробов и бактерицида приготовьте водяную баню с регулируемой температурой 18 °С. Если выше 19 °С. погрузите пробирки в холодную воду, в которую время от времени добавляют маленькие кусочки льда, чтобы предотвратить повышение температуры выше 18 °С.

с. Относительное соотношение массы исследуемых микроорганизмов и бактерицида, 50:1.—

Удобное количество бактерицидного раствора - пять кубических сантиметров, и к нему следует добавить 0,1 стакана эмульсии тестируемых зародышей.

г. Основная масса образца, удаляемого из смеси Микроб + бактерицид в каждый из периодов времени, 0,1°с—

Этого достаточно, чтобы получить достоверный образец содержания микробов в смеси, и в то же время недостаточно для оказания какого-либо ингибирующего действия при переносе в субкультурную среду.

е. Субкультурная среда. Бульон из желчных кислот.—

Для получения немедленного разведения переносимого бактерицида необходима жидкая среда; в то же время предпочтительно использовать селективную среду, которая способствует росту тестируемого зародыша, исключая организмы, способные загрязнять препарат, и, по возможности, такую среду, которая дает характерный вид культуры.

Бульон из желчных солей (стр. 180) сочетает в себе эти пожелания; он допускает только рост кишечных бактерий, в то время как образование кислой реакции и газообразование в субкультурах, приготовленных из микробно-бактерицидной смеси, являются довольно полным доказательством присутствия живой *B. coli*.

Количество среды, присутствующей в каждой пробирке, имеет большое значение, поскольку среда не только обеспечивает размножение тестируемого зародыша, но и действует как разбавитель бактерицида, снижая его силу ниже коэффициента ингибирования. Для обычной работы каждая пробирка с субкультурой содержит 10 мл среды, но очевидно, что бактерицид иф-х обладает коэффициентом ингибирования 0,1%. добавление 0,1 гр.гр. в размере 10 процентов. решение 10С.гр. средне бы целесообразно допустить последующего роста зародыша тест после контакта периода недостаточно, чтобы уничтожить его жизненную силу. Следовательно, предварительные тесты в некоторых случаях могут указывать на необходимость присутствия 12°с, 15°с или более жидкой среды в культуральных пробирках.

ф. Температура инкубации, 37°С.—

г. Период наблюдения за субкультурами, семь дней.—

Чтобы определить, были ли уничтожены тестируемые зародыши, наблюдения всегда необходимо продолжать — когда рост, по—видимому, отсутствует - до истечения семи дней, прежде чем регистрировать "отсутствие роста".

h. Идентификация организмов, развивающихся в субкультурах после контакта в растворе Микроб + бактерицид.—

Это основано на наблюдаемых невооруженным глазом признаках роста в бульоне из желчных солей, дополненных, где необходимо, методами посева, дальнейшими подкультурами на углеводных средах и экспериментами по агглютинации. Знак (+) используется для обозначения того, что рост тестируемого организма происходил в субкультурах, а знак (-) указывает на то, что тестируемые микробы были уничтожены и последующего роста не происходило.

Способ.—

Требуемое оборудование:

Стерильные пробирки (узкие, не более 1,3 см в диаметре).

Подставка для пробирок (рис. 219).

Стерильные градуированные пипетки в футляре, 1 ст.л. (в десятых долях).

Стерильные градуированные пипетки в футляре, 5 мл (в градусах Цельсия).

Круглые резиновые шайбы диаметром 2,5 см с центральным отверстием стерилизуют кипячением непосредственно перед использованием, затем перекладывают в стерилизованную стеклянную двойную посуду.

Электрические сигнальные часы или секундомер.

Стерильные щипцы.

Стерилизованные стеклянные шарики.

Машина для встряхивания.

Жирный карандаш.

Требуемые материалы:

Процентные растворы бактерицида-х (*видео*, стр. 481).

Процентные растворы чистого фенола (*видео*, стр. 482).

Водная эмульсия *B. coli* (*видео*, стр. 481).

Тюбики с бульоном из желчных солей.

Предварительные испытания.—

а. Коэффициент торможения.—

Определите наименьший процент бактерицида-х, который подавляет рост *B. coli* в бульоне с желчными солями, и наибольший процент, который не подавляет (стр. 311). По результатам этого эксперимента определите объем среды, необходимый для субкультурных пробирок, и процентное содержание растворов, которые будут использованы в пробной поездке.

Предполагая, что коэффициент ингибирования равен 1:1000, в последующих экспериментах будет вполне безопасно использовать обычные культуральные пробирки, содержащие среду при температуре 10°C.

б. Пробная поездка.—

Определите летальный эффект серии из пяти растворов бактерицида-х (скажем, 1:100, 1:250, 1:300, 1:500, 1:600) при времени контакта 2-1/2, 5, 25 и 30 минут) следующим образом:

1. Расположите пять пробирок с маркировкой от А до Е в нижнем ярусе стеллажа для пробирок.

2. В пробирку наберите пипеткой 5 мл раствора бактерицида в соотношении 1:100.

В пробирку В пипеткой вводят 5 ст.л. бактерицидного раствора в соотношении 1:200.

В пробирку С пипеткой в количестве 5 капель бактерицидного раствора в соотношении 1:300.

В пробирку D пипеткой заливается 5 мл раствора бактерицида в соотношении 1:500.

В пробирку Е пипеткой 5 мл раствора бактерицида в соотношении 1:600.

3. Расположите 20 пробирок с бульоном из желчных солей на верхнем ярусе подставки для пробирок в два ряда, те, что в первом ряду, пронумерованы последовательно слева направо 1-10, те, что в заднем ряду 11-20.

4. Установите квадратную проволочную корзину вместимостью примерно 50 пробирок слева от стойки для пробирок для приема инокулированных пробирок.

5. Достаньте из футляра стерильную пипетку объемом 1 ст.л., подцепите пинцетом стерильную резиновую шайбу и протолкните кончик пипетки в центральное отверстие.

6. Положите щипцы на верстак так, чтобы стерильные кончики выступали за край. Не снимая пробирку с подставки, снимите ватную пробку с пробирки А и опустите пипетку с прикрепленной к ней резиновой прокладкой в открытое горлышко пробирки; с помощью щипцов для фиксации шайбы протолкните пипетку через отверстие до тех пор, пока кончик пипетки не окажется на расстоянии нескольких миллиметров от дна пробирки (см. рис. 219).

7. Таким же образом вставьте пипетку и шайбу в горловину каждой из других пробирок В, С, D и Е.

8. Установите электрические сигнальные часы так, чтобы они звонили о начале эксперимента и с последующими интервалами в 2-1/2, 5, 25 и 30 минут.

9. Наберите 0,5 стакана эмульсии *B. coli* стерильной пипеткой с градуировкой в десятые доли кубического сантиметра и приготовьтесь.

10. Как только раздастся звонок, левой рукой извлеките пипетку из пробирки А и из заряженной пипетки, которую держите в правой руке, добавьте 0,1 стакана эмульсии *B. coli* в раствор 1: 100. Затем замените пипетку и шайбу.

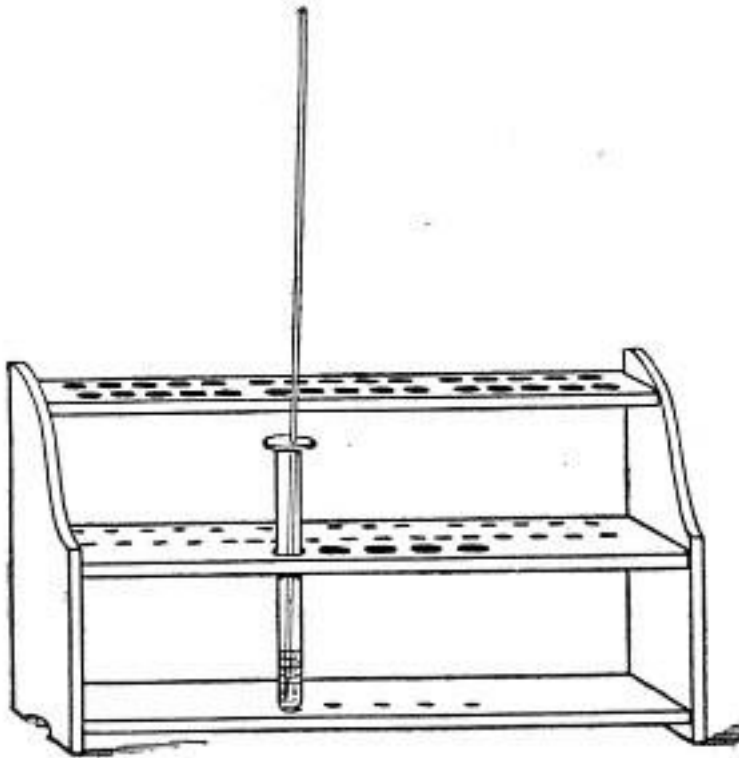


Рис. 219—Подставка для пробирок.

11. Поднимите пробирку левой рукой и встряхните ее, чтобы смешать бактерии и бактерицид, одновременно возвращая дозирующую пипетку в правую руку.

12. Повторите процедуру с пробирками В, С, D и Е; затем опустите инфицированную пипетку в банку с лизолом. Инокуляцию из пяти пробирок можно провести очень быстро, но для каждой пробирки должен быть отведен период в 10 секунд.

13. Когда прозвонит звонок через 2-1 / 2 минуты, продуйте через пипетку в пробирке А (это перемешивает смесь микроб + бактерицид и обеспечит отбор надлежащей пробы); дайте смеси попасть в пипетку, и поскольку столб жидкости будет значительно превышать конечную градуировку, указательный палец правой руки, установленный на торце пипетки перед ее поднятием, удержит более 0,1 ° с смеси внутри отверстия, когда кончик пипетки не будет касаться жидкости в пробирке. Прикоснитесь кончиком пипетки к внутренней стенке пробирки и дайте стечь избытку жидкости, удерживая в пипетке только 0,1°с.

14. В то же время левой рукой снимите пробирку № 1 для солей желчи с верхнего яруса подставки, выньте ватную пробку рукой, уже держащей пипетку (взаимное расположение пипетки, пробки и пробирок для посева практически такое же, как у платиновой петли, пробки и пробирки для посева, показанных на рис. 68, стр. 74).

15. Вставьте кончик пипетки в пробирку для подкормки и выдуйте смесь в среду — снова закройте пробирку и опустите ее в проволочную корзину. Замените шайбу-пипетку в пробирке А.

Как только кончик пипетки войдет в горловину пробирки А, ее можно отпустить, поскольку она уже отрегулирована таким образом, что просто очищает дно пробирки, а эластичная шайба предотвратит любое повреждение пробирки.

Этапы 13, 14 и 15 занимают в среднем 10 секунд.

16. Повторите шаги 13, 14 и 15 с каждой из других пробирок В, С, D и Е.

17. Повторите эти различные шаги 13-16, когда прозвенит звонок через 5, 25 и 30 минут.

18. Поместите все пробирки с инокуляцией в инкубатор при температуре 37°C.

19. Исследуйте пробирки с интервалом в 24 часа и записывайте результаты в табличной форме, как показано в таблице на стр. 491 (цифры в квадратах указывают количество часов, через которые впервые появились изменения в среде, вызванные ростом *B. coli*).

20. Если анализ результатов, приведенных в таблице, показывает силу действия бактерицида-х lethal в течение 2-1 / 2 и 30 минут, может быть организован окончательный тест, но если этот результат не был достигнут, вероятно, будут получены достаточные доказательства, позволяющие спланировать повторный пробный тест, который даст необходимую информацию.

Заключительный тест.—

с. Определение фенольного коэффициента.—

Рентгеновское дезинфицирующее средство.— Это включает в себя два отдельных теста: один на бактерицид-х, другой на стандартный фенол.

1. Расставьте пять пробирок с четкими маркировками в нижнем ярусе стеллажа.

2. Вводите пипеткой в каждые 5 мл соответственно пятипроцентных растворов х-дезинфицирующего средства, которые, как уже показал пробный запуск, будут включать те, которые обеспечивают летальный исход через 2-1 / 2 и 30 минут.

3. Расположите 20 пробирок с бульоном из желчных солей на верхнем ярусе подставки для пробирок в два ряда, те, что в первом ряду, пронумерованы последовательно слева направо 1-10, те, что в заднем ряду 11-20.

4. Разложите еще 20 пробирок с бульоном из желчных солей под номерами 21-40 в два ряда на второй подставке меньшего размера, которую можно установить на верхнем ярусе стойки, как только будут сделаны прививки в первые 20 пробирок.

5. Установите квадратную проволочную корзину вместимостью примерно 50 пробирок слева от стойки для пробирок для приема инокулированных пробирок.

6. Вставьте стерильную пипетку объемом 1 мл в горловину каждой из пробирок А, В, С, D и Е с помощью шайбы, как описано ранее.

7. Установите электрические сигнальные часы так, чтобы они звонили в начале эксперимента, а затем в 2-1/2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 и 35 минут.

8. Выполните в точности, как указано в пробных запусках, шаги 9-19.

Контрольный фенол.—

Сразу же после инокуляции пробирки с субкультурой после 30-минутного периода контакта проведите точно такой же эксперимент, в котором пять процентных концентраций фенола, (напр., фенол, содержащийся в субкультуре),, 1.1, 1.0, 0.9, 0.75, 0.7) расположены в нижнем ярусе стеллажа для пробирок на месте пяти сильнодействующих бактерицидов-х.

Рассчитайте фенольный коэффициент следующим методом:

(а) разделите цифру, представляющую процентную концентрацию самого слабого смертельного разведения контрольной карболовой кислоты в течение 2-1 / 2-минутного периода контакта, на цифру, представляющую процентную концентрацию самого слабого смертельного разведения х-дезинфицирующего средства в тот же период. Частное = коэффициент содержания фенола через 2-1/2 минуты.

(b) аналогичным образом получить коэффициент фенола при 30-минутном периоде контакта.

(с) запишите среднее значение двух коэффициентов, полученных в (а) и (b), как *средний фенольный коэффициент* или просто как **фенольный коэффициент**.

Подробная информация об окончательном тестировании фактического определения приведена в прилагаемой таблице.

ТАБЛИЦА 27

Используемый организм, B. Coli Communis.

Питательная среда, питательный агар (+10). Возраст - 24 часа. Температура инкубации 37°C.

Используемые количества {Культуральная} Эмульсия 0,1°с + 5°с Бактерицид.
{ Эмульсия }

комнатной температуре в ходе экспериментов, 17°C.

бактерицидное	прочности	время выдержки								инкубации	
		2-1/2	5	10	15	20	25	30	35	время,	темп.
1 бактерицидное-х	4%	—	—	—	—	—	—	—	—	7 дней.	37°C.
2 бактерицидное-х	3%	48	—	—	—	—	—	—	—	7 дней.	37°C.
3 бактерицидное-х	2%	24	24	24	24	48	72	...	...	7 дней.	37°C.
4 бактерицидное-х	1%	24	24	24	24	72	24	72	...	7 дней.	37°C.
5 бактерицидное-х	0.5%	24	24	24	24	24	24	24	24	24 часа.	37°C.
1 фенол	1.10%	—	—	—	—	—	—	—	—	7 дней.	37°C.
2 фенол	1.00%	24	...	...	...	...	...	...	...	7 дней.	37°C.
3 фенол	0.75%	24	24	24	24	48	...	...	...	7 дней.	37°C.
4 фенол	0.70%	24	24	24	24	24	72	...	...	7 дней.	37°C.
5 фенол -	0.65%	24	24	24	24	24	48	24	24	2 дн.	37°C.

$$\text{фенола коэффициент} = \frac{((1.10/4.00) + (0.7/2.0))}{2} = \frac{0.27 + 0.35}{2} = \frac{.62}{2} = 0.31$$

ПРИЛОЖЕНИЕ.

МЕТРИЧЕСКАЯ И ИМПЕРСКАЯ СИСТЕМЫ МЕР И ВЕСОВ.

Начальной единицей метрической системы является Метр (м.) или единица длины, представляющая одну четвертую миллионной части окружности земли вокруг полюсов.

Единицей массы является грамм (г.), который представляет собой вес одного кубического сантиметра воды при ее максимальной плотности (а именно. 4° С и давление 760 мм ртутного столба).

Единицей измерения емкости является литр (л.), который представляет собой объем килограмма дистиллированной воды при ее максимальной плотности.

Десятичные подразделения каждой из единиц обозначаются латинскими приставками *milli* = 1/1000; *centi* = 1/100; *deci* = 1/10; кратные каждой единице числа обозначаются греческими приставками *deka* = 10; *hecto* = 100; *килограмм* = 1000; *мирия* = 10000.

Для сравнения значений некоторых наиболее часто используемых выражений Метрической системы и Имперской системы, можно счесть удобным для справки следующее:

Длина:

1 миллиметр (= 1 мм) = 1/25 дюйма.

1 сантиметр (= 1 см.) = 2/5 дюйма.

1 дюйм (1 ") = 25 миллиметров или 2-1 / 2 сантиметра.

Масса:

1 миллиграмм (= 1 мг) = 0,01543 грана (или приблизительно 1/64 грана).

1 грамм (= 1 г.) = 15,4323 грана.

1 "кило" или килограмм (= 1 кг) = 2 фунтам, 3-1 / 4 унции без сахара.

1 фунт авоирдупуа (= 1 фунту) = 453,592 грамма.

1 унция авокадо (= 1 унция) = 28,35 грамма.

1 зернышко = 0,0648 грамма или 64,8 миллиграмма.

Вместимость:

1 кубический сантиметр (= 1 куб.см) = 16,9 минимальных имперских мер.

1 литр (= 1 л.) = 35,196 унции жидкости имперской мерой.

1 унция жидкости имперской мерой (= 1 $\frac{3}{4}$) = 28,42 кубических сантиметра.

1 пинта имперской меры (= 1 O) = 568,34 кубических сантиметра.

1 галлон имперской меры (= 1 ° C) = 4,546 литра, или 10 фунтов на квадратный дюйм, чистой воды при температуре 62 ° F. и атмосферном давлении 30 дюймов ртутного столба.

Факторы для перехода из одной системы в другую.

Для пересчета граммов в зерна	× 15,432.
Для пересчета граммов в унции избегайте калорий	× 0,03527.
Для преобразования килограммов в фунты	× 2,2046.
Для преобразования кубических сантиметров в имперские жидкие унции	× 0.0352.
Перевести литры в жидкие унции по-имперски	× 35,2.
Перевести метры в дюймы	× 39,37.
Перевести зерна в граммы	× 0,0648.
Для преобразования унций без жира в граммы	× 28,35.
Для преобразования тройских унций в граммы	× 31,104.
Для преобразования жидких унций в кубические сантиметры	× 28,42.
Для преобразования пинт в литры	× 0,568.
Для преобразования дюймов в метры	× 0.0254.

ТАБЛИЦА ДЛЯ ПЕРЕВОДА ГРАДУСОВ ПО ЦЕЛЬСИУ В ГРАДУСЫ ФАРЕНГЕЙТА.

$$X.^{\circ}C = ((9x/5) + 32)^{\circ}F.$$

Цент.	Фахт.	Цент.	Фахт.	Цент.	Фахт.
0	32.0	34	93.2	68	154.4
1	33.8	35	95.0	69	156.2
2	35.6	36	96.8	70	158.0
3	37.4	37	98.6	71	159.8
4	39.2	38	100.4	72	161.6
5	41.0	39	102.2	73	163.4
6	42.8	40	104.0	74	165.2
7	44.6	41	105.8	75	167.0
8	46.4	42	107.6	76	168.8

9	48.2	43	109.4	77	170.6
10	50.0	44	111.2	78	172.4
11	51.8	45	113.0	79	174.2
12	53.6	46	114.8	80	176.0
13	55.4	47	116.6	81	177.8
14	57.2	48	118.4	82	179.6
15	59.0	49	120.2	83	181.4
16	60.8	50	122.0	84	183.2
17	62.6	51	123.8	85	185.0
18	64.4	52	125.6	86	186.8
19	66.2	53	127.4	87	188.6
20	68.0	54	129.2	88	190.4
21	69.8	55	131.0	89	192.2
22	71.6	56	132.8	90	194.0
23	73.4	57	134.6	91	195.8
24	75.2	58	136.4	92	197.6
25	77.0	59	138.2	93	199.4
26	78.8	60	140.0	94	201.2
27	80.6	61	141.8	95	203.0
28	82.4	62	143.6	96	204.8
29	84.2	63	145.4	97	206.6
30	86.0	64	147.2	98	208.4
31	87.8	65	149.0	99	210.2
32	89.6	66	150.8	100	212.0
33	91.4	67	152.6		

ТАБЛИЦА ДЛЯ ПЕРЕВОДА ГРАДУСОВ ПО ФАРЕНГЕЙТУ В ГРАДУСЫ По ЦЕЛЬСИЮ.

$X^{\circ} F. = (5(x - 32))/9^{\circ}C.$

Фахт.	Цент.	Фахт.	Цент.	Фахт.	Цент.	Фахт.	Цент.	Фахт.	Цент.
32	0.	68	20.0	104	40.0	140	60.0	176	80.0
33	0.6	69	20.6	105	40.6	141	60.6	177	80.6
34	1.1	70	21.1	106	41.1	142	61.1	178	81.1
35	1.7	71	21.7	107	41.7	143	61.7	179	81.7
36	2.2	72	22.2	108	42.2	144	62.2	180	82.2
37	2.8	73	22.8	109	42.8	145	62.8	181	82.8
38	3.3	74	23.3	110	43.3	146	63.3	182	83.3

39	3.9	75	23.9	111	43.9	147	63.9	183	83.9
40	4.4	76	24.4	112	44.4	148	64.4	184	84.4
41	5.0	77	25.0	113	45.0	149	65.0	185	85.0
42	5.6	78	25.6	114	45.6	150	65.6	186	85.6
43	6.1	79	26.1	115	46.1	151	66.1	187	86.1
44	6.7	80	26.7	116	46.7	152	66.7	188	86.7
45	7.2	81	27.2	117	47.2	153	67.2	189	87.2
46	7.8	82	27.8	118	47.8	154	67.8	190	87.8
47	8.3	83	28.3	119	48.3	155	68.3	191	88.3
48	8.9	84	28.9	120	48.9	156	68.9	192	88.9
49	9.4	85	29.4	121	49.4	157	69.4	193	89.4
50	10.0	86	30.0	122	50.0	158	70.0	194	90.0
51	10.6	87	30.6	123	50.6	159	70.6	195	90.6
52	11.1	88	31.1	124	51.1	160	71.1	196	91.1
53	11.7	89	31.7	125	51.7	161	71.7	197	91.7
54	12.2	90	32.2	126	52.2	162	72.2	198	92.2
55	12.8	91	32.8	127	52.8	163	72.8	199	92.8
56	13.3	92	33.3	128	53.3	164	73.3	200	93.3
57	13.9	93	33.9	129	53.9	165	73.9	201	93.9
58	14.4	94	34.4	130	54.4	166	74.4	202	94.4
59	15.0	95	35.0	131	55.0	167	75.0	203	95.0
60	15.6	96	35.6	132	55.6	168	75.6	204	95.6
61	16.1	97	36.1	133	56.1	169	76.1	205	96.1
62	16.7	98	36.7	134	56.7	170	76.7	206	96.7
63	17.2	99	37.2	135	57.2	171	77.2	207	97.2
64	17.8	100	37.8	136	57.8	172	77.8	208	97.8
65	18.3	101	38.3	137	58.3	173	78.3	209	98.3
66	18.9	102	38.9	138	58.9	174	78.9	210	98.9
67	19.4	103	39.4	139	59.4	175	79.4	211	99.4
								212	100.0

Процентная формула для добавления солей и т.д. В готовую среду.

Формула для приготовления любого желаемого процентного содержания данной соли и т.д. в пробирных средах; *например*, для получения 4%. раствор KNO_3 в серии пробирок с бульоном, каждая из которых содержит по 10 мл среды, когда в наличии уже имеется 25%. приготовьте водный раствор нитрата калия.

$$\frac{(N + X) Y}{100} = \frac{A (X)}{100}$$

N = количество кубических сантиметров, содержащихся в каждой пробирке.

X = количество исходного раствора, которое необходимо добавить в каждую пробирку.

Y = требуемое процентное содержание в среде.

A = процентное содержание исходного раствора.

Тогда

$$\frac{(10 + X) 4}{100} = \frac{25X}{100}$$

Следовательно, $40 + 4X = 25X$.

Следовательно, $21X = 40$.

$X = 1,9$ у.е.

Это позволяет добавлять раствор к исходному объему среды.

Следовательно, 10 ст.л. бульона + 1,9 ст.л. 25-процентной добавки. водный раствор KNO_3 составляет 11,9%. Среда содержит 4%. KNO_3 .

ТАБЛИЦЫ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАЗВЕДЕНИЙ

(сыворотки, Дезинфицирующих средств или других веществ.)

При оценке содержания агглютинаина или *титра* сыворотки, тестировании дезинфицирующих средств и для многих других целей возникает необходимость приготовить серию разведений исследуемого материала, и во избежание ненужных затрат труда удобно придерживаться некоторой определенной шкалы увеличения, такой, например, как следующая:

При разведении от 1:10 до 1:80 увеличивайте дозу с шагом 5.

При разведении от 1:80 до 1:200 увеличивайте дозу с шагом 10.

При разведении от 1:200 до 1:400 увеличивайте дозу с шагом 25.

При разведении от 1:400 до 1:500 увеличивайте дозу с шагом 50.

От разведений 1:500 до 1:1000 увеличивайте с шагом 100.

От разведений 1: 1000 до 1:5000 увеличивайте с шагом 250.

От разведений от 1: 5000 до 1:10 000 увеличивайте с шагом 1000.

От разведений от 1:10 000 до 1:100 000 увеличивайте с шагом 5000.

От разведений 1:100 000 до 1:1 000 000 увеличивайте с шагом 100 000.

Когда имеешь дело с веществом неизвестной силы — и это особенно верно в отношении агглютинирующих сывороток — обычно проводят предварительный тест, используя несколько разведений с большим интервалом разведения, которые могут быть получены следующим образом:

Первое разведение—I.

1 ст.л. сыворотки + 9 ст.л. обычного физиологического раствора = 10%. раствор или разведение 1: 10 (из которых 1 ч.л. содержит 0,1 ч.л. исходной сыворотки).

При работе с жидкостями, отличными от сыворотки, разбавителем обычно является дистиллированная вода; в то время как, если исходное вещество является твердым, инструкция должна гласить:

1 грамм о.с. + 10°с. дистиллированная вода = 10%. раствор и т.д.

Второе разведение—II.

1 ст.л. первого разведения + 9 ст.л. обычного физиологического раствора = 1%. раствор или разведение 1:100.

Третье разведение—III.

1 ст.л. второго разведения + 9 ст.л. обычного физиологического раствора = 1 промилле раствора или разведение 1: 1000.

Четвертое разведение —внутривенное.

1 ст.л. второго разведения + 9 ст.л. обычного физиологического раствора = 0,1 промилле раствора или разведение 1: 10000.

Следующие таблицы, показывающие вторичные разведения, которые можно легко приготовить из каждого из этих четырех первичных разведений для последующего определения точного *титра*, вероятно, окажутся полезными тем, кто не является подготовленным математиком.

ТАБЛИЦЫ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАЗВЕДЕНИЙ.

Таблица I
с использованием 10 % раствора
первого разведения + разбавитель

таблице II
, используя 1% маточный раствор
второго разведения + растворитель

1: 10 = 1 гр.гр. + 0С.гр.

1: 15 = 1 гр.гр. + 0.5 гр.гр.

1: 20 = 1 гр.гр. + 1.0 гр.гр.

1: 25 = 1 гр.гр. + 1.5 ° с.гр.

1: 30 = 1 гр.гр. + 2.0 гр.гр.

1: 35 = 1 гр.гр. + 2.5 гр.гр.

1: 40 = 1 гр.гр. + 3.0 гр.гр.

1: 45 = 1 гр.гр. + 3.5 гр.гр.

1: 50 = 1 гр.гр. + 4.0 гр.гр.

1: 55 = 1 гр.гр. + 4.5 гр.гр.

1: 60 = 1 гр.гр. + 5.0 гр.гр.

1: 65 = 1 гр.гр. + 5.5 гр.гр.

1: 70 = 1 гр.гр. + 6.0 гр.гр.

1: 75 = 1 гр.гр. + 6.5 гр.гр.

1: 80 = 1 гр.гр. + 7.0 гр.гр.

1: 80 = 1 гр.гр. + 7.0 гр.гр.

1: 90 = 1 гр.гр. + 8.0 гр.гр.

1: 100 = 1 гр.гр. + 9.00 гр.гр.

1: 110 = 1 гр.гр. + 10.0 гр.гр.

1: 120 = 1 гр.гр. + 11.0 гр.гр.

[1: 125 = 1 гр.гр. + 11.5 гр.возр.]

1: 130 = 1 гр.гр. + 12,0 ц.гр.

1: 140 = 1 гр.гр. + 13.0 гр.гр.

1: 150 = 1 гр.гр. + 14.0 гр.гр.

1: 160 = 1 гр.гр. + 15.0 гр.гр.

1: 170 = 1 гр.гр. + 16.0 гр.гр.

[1: 175 = 1 гр.гр. + 16.5 с.возр.]

1: 180 = 1 гр.гр. + 17.0 гр.гр.

1: 190 = 1 гр.гр. + 18.0 гр.гр.

1: 200 = 1 гр.гр. + 19,0 ц.гр.

1: 200 = 1 гр.гр. + 19,0 ц.гр.

1: 225 = 1 гр.гр. + 21.5 гр.гр.

1: 250 = 1 гр.гр. + 24.0 гр.гр.

1: 275 = 1 гр.гр. + 26.5 гр.гр.

1: 300 = 1 гр.гр. + 29.0 гр.гр.

1: 100 = 1 гр.гр. + 0С.гр.

1: 110 = 1 гр.гр. + 0.1 гр.гр.

1: 120 = 1 гр.гр. + 0.2 гр.гр.

[1: 125 = 1 гр.гр. + 0.25 гр.возр.]

1: 130 = 1 гр.гр. + 0.3 гр.гр.

1: 140 = 1 гр.гр. + 0.4 градусов.гр.

1: 150 = 1 гр.гр. + 0.5 гр.гр.

1: 160 = 1 гр.гр. + 0.6 гр.гр.

1: 170 = 1 гр.гр. + 0.7 гр.гр.

[1: 175 = 1 гр.гр. + 0.75 гр.возр.]

1: 180 = 1 гр.гр. + 0.8 гр.гр.

1: 190 = 1 гр.гр. + 0.9 гр.гр.

1: 200 = 1 гр.гр. + 1.0 гр.гр.

1: 200 = 1 гр.гр. + 1.0 гр.гр.

1: 225 = 1 гр.гр. + 1.25 гр.гр.

1: 250 = 1 гр.гр. + 1.5 ° с.гр.

1: 275 = 1 гр.гр. + 1.75 гр.гр.

1: 300 = 1 гр.гр. + 2.0 гр.гр.

1: 325 = 1 гр.гр. + 2.25 гр.гр.

1: 350 = 1 гр.гр. + 2.5 гр.гр.

1: 375 = 1 гр.гр. + 2.75 гр.гр.

1: 400 = 1 гр.гр. + 3.0 гр.гр.

1: 400 = 1 гр.гр. + 3.0 гр.гр.

1: 450 = 1 гр.гр. + 3.5 гр.гр.

1: 500 = 1 гр.гр. + 4.0 гр.гр.

1: 500 = 1 гр.гр. + 4.0 гр.гр.

1: 600 = 1 гр.гр. + 5.0 гр.гр.

1: 700 = 1 гр.гр. + 6.0 гр.гр.

[1: 750 = 1 гр.гр. + 6.5 гр.возр.]

1: 800 = 1 гр.гр. + 7.0 гр.гр.

1: 900 = 1 гр.гр. + 8.0 гр.гр.

1: 1000 = 1 гр.гр. + 9.0 С. гр.

1: 1000 = 1 гр.гр. + 9.0 С. гр.

1: 325 = 1 гр.гр. + -31.5 с.гр.
 1: 350 = 1 гр.гр. + 34.0 гр.гр.
 1: 375 = 1 гр.гр. + 36.5 гр.гр.
 1: 400 = 1 гр.гр. + 39.0 гр.гр.

 1: 400 = 1 гр.гр. + 39.0 гр.гр.
 1: 450 = 1 гр.гр. + 44,5 ц.гр.
 1: 500 = 1 гр.гр. + 49.0 гр.гр.

1: 2000 = 1 гр.гр. + 19,0 ц.гр.
 1: 3000 = 1 гр.гр. + 29.0 гр.гр.
 1: 4000 = 1 гр.гр. + 39.0 гр.гр.
 1: 5000 = 1 гр.гр. + 49.0 гр.гр.

Таблица III
 с применением 0,1% раствора
 третьем разведении + разбавитель

1: 1000 = 1 гр.гр. + 0С.гр.
 1: 1250 = 1 гр.гр. + 0.25 гр.гр.
 1: 1500 = 1 гр.гр. + 0.5 гр.гр.
 1: 1750 = 1 гр.гр. + 0.75 гр.гр.
 1: 2000 = 1 гр.гр. + 1.0 гр.гр.
 1: 2250 = 1 гр.гр. + 1.25 гр.гр.
 1: 2500 = 1 гр.гр. + 1.5 ° с.гр.
 1: 2750 = 1 гр.гр. + 1.75 гр.гр.
 1: 3000 = 1 гр.гр. + 2.0 гр.гр.
 1: 3250 = 1 гр.гр. + 2.25 гр.гр.
 1: 3500 = 1 гр.гр. + 2.5 гр.гр.
 1: 3750 = 1 гр.гр. + 2.75 гр.гр.
 1: 4000 = 1 гр.гр. + 3.0 гр.гр.
 1: 4250 = 1 гр.гр. + 3.25 гр.гр.
 1: 4500 = 1 гр.гр. + 3.5 гр.гр.
 1: 4750 = 1 гр.гр. + 3.75 гр.гр.
 1: 5000 = 1 гр.гр. + 4.0 гр.гр.
 1: 5000 = 1 гр.гр. + 4.0 гр.гр.
 1: 6000 = 1 гр.гр. + 5.0 гр.гр.
 1: 7000 = 1 гр.гр. + 6.0 гр.гр.
 [1: 7500 = 1 гр.гр. + 6.5 гр.возр.]
 1: 8000 = 1 гр.гр. + 7.0 гр.гр.
 1: 9000 = 1 гр.гр. + 8.0 гр.гр.
 1: 10,000 = 1 гр.гр. + 9.0 С. гр.

таблица IV
 использованием 0,01% раствора
 четвертый разрежения + растворитель

1: 10,000 = 1 гр.гр. + 0С.гр.
 1: 15,000 = 1 гр.гр. + 0.5 гр.гр.
 1: 20,000 = 1 гр.гр. + 1.0 гр.гр.
 1: 25,000 = 1 гр.гр. + 1.5 ° с.гр.
 1: 30,000 = 1 гр.гр. + 2.0 гр.гр.
 1: 35,000 = 1 гр.гр. + 2.5 гр.гр.
 1: 40,000 = 1 гр.гр. + 3.0 гр.гр.
 1: 45,000 = 1 гр.гр. + 3.5 гр.гр.
 1: 50,000 = 1 гр.гр. + 4.0 гр.гр.
 1: 55,000 = 1 гр.гр. + 4.5 гр.гр.
 1: 60,000 = 1 гр.гр. + 5.0 гр.гр.
 1: 65,000 = 1 гр.гр. + 5.5 гр.гр.
 1: 70,000 = 1 гр.гр. + 6.0 гр.гр.
 1: 75,000 = 1 гр.гр. + 6.5 гр.гр.
 1: 80,000 = 1 гр.гр. + 7.0 гр.гр.
 1: 85,000 = 1 гр.гр. + 7.5 гр.гр.
 1: 90,000 = 1 гр.гр. + 8.0 гр.гр.
 1: 100,000 = 1 гр.гр. + 9.0 С. гр.

 1: 100,000 = 0.1 гр.гр. + 0.9 гр.гр.
 1: 200,000 = 0.1 гр.гр. + 1.9 гр.гр.
 [1: 250,000 = 0.1 гр.гр. + 2.4 ° с.возр.]
 1: 300,000 = 0.1 гр.гр. + 2.9 гр.гр.
 1: 400,000 = 0.1 гр.гр. + 3.9 гр.гр.

1: 10,000 = 1 гр.гр. + 9.0 С. гр.

1: 15,000 = 1 гр.гр. + 14.0 гр.гр.

1: 20,000 = 1 гр.гр. + 19,0 ц.гр.

1: 25,000 = 1 гр.гр. + 24.0 гр.гр.

1: 30,000 = 1 гр.гр. + 29.0 гр.гр.

1: 500,000 = 0.1 гр.гр. + 4.9 градусов.гр.

1: 500,000 = 0.1 гр.гр. + 4.9 градусов.гр.

1: 600,000 = 0.1 гр.гр. + 5.9 гр.гр.

1: 700,000 = 0.1 гр.гр. + 6.9 гр.гр.

[1: 750,000 = 0.1 гр.гр. + 7.4 гр.возр.]

1: 800,000 = 0.1 гр.гр. + 7.9 гр.гр.

1: 900,000 = 0.1 гр.гр. + 8.9 гр.гр.

1:1,000,000 = 0.1 гр.гр. + 9.9 гр.гр.

ТАБЛИЦА ТЕМПЕРАТУРНОГО ДАВЛЕНИЯ.

Температура по Цельсию	мм рт. ст.	Фунтов на кв. в. абсолютного давления	атмосфер
98°	707.1	13.7	0.93
99°	733.1	14.2	0.96
100°	760.0	14.7	1.00
101°	787.8	15.2	1.03
102°	816.0	15.8	1.07
103°	845.2	16.3	1.11
104°	875.4	16.9	1.15
105°	906.4	17.5	1.19
106°	938.3	18.1	1.23
107°	971.1	18.8	1.27
108°	1004.9	19.4	1.32
109°	1039.6	20.1	1.36
110°	1075.3	20.8	1.41
111°	1112.0	21.5	1.46
112°	1149.8	22.2	1.51
113°	1188.6	22.9	1.56
114°	1228.4	23.7	1.61
115°	1269.4	24.5	1.67

116°	1311.4	25.3	1.72
117°	1354.6	26.2	1.78
118°	1399.0	27.0	1.84
119°	1444.5	27.9	1.90
120°	1491.2	28.8	1.96
121°	1539.2	29.7	2.02
122°	1588.4	30.7	2.09
123°	1638.9	31.7	2.15
124°	1690.7	32.7	2.22
125°	1743.8	33.7	2.29

СТОЛ ДЛЯ СУШКИ При НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ В ВАКУУМЕ.

Температура по	Цельсию,
Мм рт. ст.	21°
18,4	22°
19,6	23°
20,8	24°
22,1	25°
23,5	
26°	24,9
27°	26,4
28°	28,0
29°	29.7
30°	
31°	33.3
32°	35.3
.	37,3
34°	39,5
35°	41,7
36°	44,1
37°	46,6
38°	49,2

39°	51,9
40°	54,8
41°	57.8
42°	61.0
43°	64.3
44°	67.7
45°	46°
75,1	47°
79,0	
48°	83,1
49°	87,4
50°	91,9

АНТИФОРМИНОВЫЙ СПОСОБ

Для выявления В. Tuberculosis.

Антиформин был введен в бактериологическую технику Уленхутом в 1908 году с целью выявления туберкулезных палочек, когда они присутствуют в небольшом количестве в мокроте или другом материале. Это мощный окислитель, который быстро уничтожает большинство бактерий, но туберкулез и другие кислотоустойчивые организмы длительное время сопротивляются его смертельному действию, и на этом факте основан метод.

Для приготовления Антиформина отмерьте и смешайте:—

Eau de Javelle (Ликерная содовая хлоринат—В.Р.) 50 гр.

Гидрат натрия 15%. водный раствор 50 °с

Способ.

1. Наберите мокроту или другой материал (например, молочный налет и сливки; гной; измельченную железу или другой орган; казеозный материал; разрушенные очаги и т.д.) В стерильную пробирку и затем добавьте равный объем антиформина.
2. Закройте тубик резиновой пробкой и энергично встряхните (образец антиформина, который не "пенится" на этой стадии, малопригоден). сразу же начинается разложение материала, связанные бактерии уничтожаются, и смесь быстро превращается в однородную, но мутную жидкость — процесс, который можно ускорить, если:—
3. Поместить пробирку в инкубатор при температуре 37°С. на 30 минут, время от времени встряхивая.

4. Тщательно центрифугируйте жидкость на высокой скорости.
5. Отцедите надосадочную жидкость пипеткой, наполните стерильной дистиллированной водой, закупорьте пробирку и встряхните, чтобы осадок распределился по воде. Снова центрифугируйте.
6. Повторите шаги 4 и 5 еще дважды.
7. Используйте одну часть последнего осадка для прививки морских свинок.
8. Высыпьте оставшийся осадок на яичную среду Dorset; закройте и инкубируйте при 37 °C.

Примечание.—Если необходимы только микроскопические пленки, заполните центрифужную пробирку лигроином (петролейным эфиром) вместо стерильной дистиллированной воды на этапе 5 и подготовьте пленки с *поверхности* жидкости для окрашивания по процессу Циля-Нельсена.

Указатель

Аббе конденсор, [7](#)

Эббота пятно на споры, [107](#)

абerrации, хроматические, [56](#)
шаровидные, [55](#)

абсолютного спирта в качестве фиксатора, [82](#)
в качестве антисептика, [27](#)

промокательной бумаги для высыхания покрытия-слипы, [69](#)

А. Е. С. смесь, [345](#)

уксусной кислоты для очистки пленок, [82](#)

ахроматический конденсатор, [54](#)

кислота hæmatin, [96](#)
продукции, анализ таблицы, [283](#)
бактериями, [145](#)
расследование, [280](#)
экспертизу, [283](#), [284](#)
количественного исследования, [280](#)

кислотоустойчивых микобактерий в тканях, испачкать, [124](#)

действию различных газов на бактерии, [295](#)

активной иммунизации, наглядный пример, [322](#)

регулируемый водяной бане, [299](#)

аэробных культур, [221](#)

аэрогенный бактерий, [131](#)

Aesculin agar, [204](#)

агар желатин (guarniari), [194](#)

методов подготовки, [167](#)

поверхности плиты, [232](#)

агар-агар, подготовка, [167](#)

реакции агглютинации, макроскопические, [386](#)

микроскопические, [385](#)

лектин, [381](#)

воздуха, анализ, [468](#)

фильтра, [40](#)

насоса, Geryk, [43](#)

раствора альбумина, Майера, [120](#)

алкогольной продукции; проверить, [285](#)

щелочной пиро, [239](#)

квасцовый кармин, [96](#)

производства аммиака проверить, [285](#)

Amphitrichous бактерий, [136](#)

анаэробных культур, [236](#)

Боткина способ, [243](#)

Бюхнера способ, [238](#)

Буллок метод, [245](#)

Гессе способ, [237](#)
Маклеода способ, [240](#)
медиа, [180](#)
новый метод, [244](#)

анаэробных культур, ру биологический метод, [237](#)
физический метод, [237](#)
вакуумным методом, [238](#)
Райта метод, [239](#)

Anæsthetics, [345](#)

анализа воздуха, аппарат для, [469](#)
способ, [468](#)
качественного бактериологического, [470](#)
количественного бактериологического, [468](#)
масла, качественного бактериологического, [458](#)
количественного бактериологического, [457](#)
сливок, качественного бактериологического, [458](#)
количественного бактериологического, [457](#)
рыб, [460](#)
мороженого, качественного бактериологического, [457](#)
мяса, аппарат для, [460](#)
методом, [460](#)
качественного бактериологического, [462](#)
молока, аппарат для, [444](#)
коллекции образцов, [441](#)
метод, [441](#)
качественного бактериологического, [446](#).
количественные бактериологические, [444](#)
устриц, [463](#)
сточных вод, качественного бактериологического, [467](#)
количественного бактериологического, [466](#)
моллюсков, [463](#)
грунта, аппарат для, [473](#)
сборник образцов, [471](#)
метод, [470](#)
качественного бактериологического, [476](#)
количественного бактериологического, [473](#)
воды, аппарат для, [420](#), [427](#)
сборник образцов, [416](#)
метод, [416](#)
качественного бактериологического, [426](#)

анализа воды, количественного бактериологического, [420](#)

анилиновые красители, [83](#)

генцианвиолет, [95](#)

воде, приготовить, [108](#)

животной ткани СМИ (Frugoni), [210](#)

животных, природных инфекций, [337](#)

Antiformin метод Б. туберкулез, [502](#)

антигена, определение, [324](#)

антисептики, [27](#)

действия, [310](#)

видимой грязи в молоке, [450](#)

Арнольда паровом стерилизаторе, [34](#)

Arthrogeous споры, [138](#)

асцитической бульон, [210](#)

жидкости агар (Вассерман), [213](#)

Ascomycetæ, [128](#)

Ascopores, [129](#)

Asparagin СМИ (Френкель и Voges), [183](#)
(Uschinsky), [183](#)

аспергилл, [127](#)

атмосферных условиях, [295](#)

ослабления вирулентности микроорганизмов, [321](#)

автоклав, [37](#)

в использовании, [37](#)

автоматической пипетки, [13](#)

вскрытий, [396](#)

вскрытие, карты индекс, [402](#)

бацилл, морфология, [132](#)

бациллы сибирской язвы в почве, [477](#)

в воде, [440](#)

coli в воде, обнаружение, [429](#)

diphtheriæ в молоке, [452](#)

enteritidis, в воде, [437](#)

sporogenes в молоке, [452](#)

в воде, [438](#)

oedematis maligni в почве, [477](#)

tetani в почве, [477](#)

в воде, [441](#)

туберкулеза в молоке, [453](#)

antiformin способ, [502](#)

typhosus в воде, [441](#)

бактерий, Анатомия, [134](#)

классификации, [131](#)

группировки, для учебы, [410](#)

в тканях, демонстрация, [114](#)

влияние окружающей среды на, [142](#)

продуктов метаболизма, [143](#)

методов идентификации, [259](#)

микроскопическом исследовании, в пятнах, [81](#)

незапятнанным, [74](#)

физиологии, [136](#)

бактерии, простые для окраски, [90](#)

бактериальной эмульсии, подготовка, [389](#)

ферментов, [144](#), [277](#)

ферментов, [144](#)

продуктов питания, [142](#)

токсины, [144](#)

бактериологических анализов, общих соображений, [415](#)

исследование крови, [377](#)

основание микроскопа, [50](#)

Базидии, [128](#)

пивного сула, приготовления, [175](#)

свекла медиа, [200](#)

Beggiotoa, морфологии, 133

бензола ванна, 256

Berkefeld фильтра, 42

Beyrinck решение я, 197

- II, в 198

желчный агар (Мак-конки), 205

бульон двойной крепости, 199

(Мак-конки), 180

биохимический анализ культур, 276

биохимия бактерий, 276

биологической дифференциации бактерий, 249

биполярного прорастания, 140

Бисмарк коричневый, 94

Blastomycetes, морфологии, 129

кровяной агар, 171, 214

пластин, животные, 251

человека, 250

(Washbourn), 214

бактериологическое исследование, 377

клеток, мойка, 388

коллекции, для серологического обследования, 379

фильмы, препараты, 376

окрашивание, 97

гистологическое исследование, 373

пипетки, 11

серологическое обследование, 378

пятна, 97

крови сыворотка (советник и Мэлори), 208

inspissated, 168

(Леффлера), 208

(Лоррена Смит), 208

духовой таблицы, 9

тубус микроскопа, [50](#)

богемный колбу, [4](#)

кипятком, [33](#)

костного мозга, фильмов, подготовка, [400](#)

борде-Gengou реакции, [393](#)

борной кислоты в молоке, проверить, [442](#)

Боткина анаэробный способ, [243](#)

бульон, подготовка, [163](#)

мозг, экстракт [149](#)

хлеб, пасту, [193](#)

бриллиантовый зеленый агар (Конради), [206](#)

желчный агар (Fawcus), [206](#)

броуновское движение, [79](#)

Бюхнера анаэробный способ, [238](#)

Буллок это анаэробный метод, [245](#)

пробки для постоянных препаратов, [407](#)

Бунге морилка, [104](#)

Бурри китайский чернильное пятно, [77](#)

сливочного масла, анализ, [457](#)

качественный анализ, [458](#)

количественного анализа, [457](#)

трупа, подготовка для вскрытия, [397](#)

клетки для морских свинок, [343](#)

на лабораторных животных, [341](#)

для мышей, [342](#)

для кроликов, [343](#)

для крыс, [342](#)

расчетную цифру для веса средней массы, [166](#), [167](#)

Камбье свеча метод выделения коли-тифозной группы, [438](#)

камера-люцида, [62](#)

Капальди-Proskaueг средств, ни я, [186](#)
второй, [187](#)

капиллярные пипетки, [10](#)
окончил, [13](#)

головчатые палочки, [139](#)

капсула образования, [134](#)
бактерий, [134](#)
термо-регулятора, [218](#)

капсулы, коллодия, прививка, [357](#)
подготовки, [357](#)
стекла, [6](#)
для очистки инфицированных, [20](#)
новый, [18](#)
к пятну, [99](#)
стерилизовать, [31](#)

углеводов СМН, подготовка, [177](#)

карболовой кислоты как бактерицидное, [27](#), [481](#)
способ изоляции коли-тифозной группы, [437](#)

Carbolised agar [202](#)
бульон, [202](#)
желатин, [202](#)

двуокиси углерода в культурах, проверить, [289](#)

картотека, [336](#), [402](#)

морковь СМН, [200](#)

масло кедра для погружения объектива, [88](#)

клеточной стенки бактерий, [134](#)

Celloidin C3K, производство, [358](#)

сотовой инкубатора, [216](#)

центрибежная машина для крови и сыворотки работы, [327](#)
молока работы, [447](#)

Centrifugalised молоко, [449](#)

Centrigade градусов, преобразования, [494](#)

химических продуктов, бактерий, [145](#)

Китае зеленый агар (Werbitski), [207](#)

хлороформе в качестве антисептика, [27](#)

хроматические aberrации, [56](#)

хромогенных бактерий, [131](#)

Chromoparous бактерий, [144](#)

Chromoporous бактерий, [144](#)

цитратной крови агар, [191](#)

Cladothrix, морфологии, [193](#)

классификации бактерий, [131](#)
грибов, [126](#)

булавовидные палочки, [139](#)

очистки фильмы с уксусной кислотой, [82](#)

кlostридии, [139](#)

грубой настройки, [51](#)

паутина микрометр, [66](#)

кокаин, [345](#)

Кокки, морфологии, [131](#)

кокцидий, инфекции, [339](#)

коэффициент, уступает летальных, [312](#)

торможения, [311](#)

фенол, [489](#)

, отличный летальных, [313](#)

Кона решение, [191](#)

холодной инкубатора, [217](#)

Коли-тифозной группы, дифференциальной таблицы, [433](#)

в молоке, [451](#)

в почве, [477](#)

изоляции, [432](#)

члены, [430](#)

взятия крови для бактериологического исследования, [378](#)

СМИ дела, [168](#)

пробах молока, [443](#)

патологического материала в течение жизни, [373](#)

гноя, [373](#)

грунта образец, [471](#)

проб воды, [416](#)

коллодия капсулы, [357](#)

СЗК, производство, [357](#)

колоний бактерий, краев, [267](#)

цветной свет, действия, [309](#)

Колумелла, [127](#)

сравнительный hæmocytoology, [374](#)

дополнение, определение, [325](#)

ремонта, испытаний, [393](#)

концентрации в воде методом, анализ, [434](#)

Конденсор ахроматический, [54](#)

темной землей, [60](#)

параболоида, [60](#)

посадочных мест, [54](#)

Condidium, [128](#)

непрерывной стерилизации, [36](#)

контрастных пятен, [93](#)

сулема (Ланг), [82](#)

ватный фильтр, [40](#)

Counterstaining фильмы, [84](#)

плиты подсчета колоний, [423](#)

покрытием против скольжения фильмы, [81](#)

в чистый новый, [22](#)

использоваться, [24](#)

ящики для пробирок, [31](#)

сливки, анализ, [457](#)

качественный анализ, [458](#)

количественного анализа, [457](#)

Crenothrix морфологии, [133](#)

критериев инфекции, [370](#)

критерий иммунитета, [324](#)

культурных символов, макроскопический осмотр, [261](#)

культуры колбу, парень, [5](#)

Колле, [4](#)

ру [5](#)

клиновидные палочки, [139](#)

накожные прививки, [352](#)

темных местах конденсатора, [60](#)

освещения, [87](#)

дочерние клетки, [129](#)

дневного света, рассеянного действия, [308](#)

десятичных Весов, [340](#)

обесцвечивание агентов, [84](#)

определение цели, [56](#)

депиляции порошок, [346](#)

описание плиты культуры, [261](#)

описательные термины, [261](#)

высушивание, воздействие, [306](#)
стола, [501](#)

Эксикатор, Мюллера, [307](#)

раствор декстрозы, подготовка, [178](#)

диафрагмы, Ирис, [53](#)

Diastatic ферменты, тесты, [278](#)

дифференциал атмосфере культивирования, [257](#)
инкубации, [255](#)
СМИ, [255](#)
окрашивания, [108](#)
стерилизации, [256](#)

разбавляя палаты, [248](#)

разбавления сосок, пипеток, [383](#)
сыворотки, [382](#)
столы, [498](#)

растворы, препараты, [496](#)

дифтерию, бациллы, в молоке, [452](#)

Diplobacilli, морфологии, [133](#)

диплококки, морфологии, [133](#)

диплококки pneumoniae вакцинация против, 322

разрывных стерилизации, 36

дисков из гипса, 192

дезинфицирующие средства, действия, 310

химической, 27

тестирования, 480

разобшая жидкость, цене Джонс;400

дозу инокулянта, 316

двойной наконечник, 58

пятен на споры, 106

сахарный агар (Рассел), 207

капельницы, 73

сухое тепло, 28

Данэм решение, 177

красителей, анилин, 83

Глиняная коробка для грязной горки, 70

нейтральных солей агар (Липман и коричневый), 197

края отдельных колоний, символы, 267

яичный белок агар, 213

бульон, (Lipschuetz), 213

медиа (Дорсет), подготовка, 174

inspissated, 212

(Lubenau), 209

(Тарханов и Колесникофф), 212

очистить питательных средах с, 166

Эрлиха окуляр, 55

Eikonometer, 65

Айзенберг молоко-рис средний, 189

электрические зубные двигателя, 360
сигнала часов, 38
теплой стадии, 59

высоты колоний, 263

Эйснер в желатин, 204
метод выделения палочки: тифозной группы, 438

эндогенные споры, 138
сортов, 139

Эндо-всхожесть, 139

английский доказательства агар, Blaxall, 193

перечисление колоний на чашках, 423
диски, Jeffer в это, 424
Пейкса', 424

обогащения методом анализа воды, 427

перечень микро-организмов, 423

условий окружающей среды, 142

фермент производства, розыска, 277

эозином, 93

Экваториальная прорастания, 140

коническую колбу, 4

Ernstschen Кернер,

136

Эсмарха рулон культуры, 226
воду собирать бутылки, 417

оценить реакцию СМИ, 280

эфира пламени, 28

водорастворимых кислот, [284](#)

Eucaine, [345](#)

возвеличивая вирулентности микроорганизмов, [320](#)

экспертизы молока, [441](#)

экспериментальных инфекций, исследование, в ходе жизни, [370](#)

вакцинация животных, [332](#)

внеклеточные токсины, [144](#)

окуляр, Эрлих, [55](#)

мкм, [63](#)

окуляры, [55](#)

глаз-тени, [57](#)

Фаренгейта преобразования, [495](#)

кормления экспериментов, [369](#)

реакции брожения, [279](#)

трубы, [17](#)

поле объективной, [56](#)

Филар микрометр, [66](#)

наполнения труб и т. п. со среды, [160](#)

фильма препараты, [81](#)

фиксации, [81](#)

делать, [81](#)

монтажа, [85](#)

окрашивания, [83](#)

фильтр свеча, закрытая, [47](#)

открытия, [43](#)

тестирования работоспособности, [478](#)

для дезинфекции, [28](#)

стерилизовать, [29](#)

фляжка, [6](#)

документы, чтобы сложить, [156](#)

фильтры, хлопок-шерсть, [40](#)

фарфор, [42](#)

испытания, [478](#)

фильтрации, [40](#)

стремлением, [42](#)

из средств массовой информации, [156](#)

под давлением, [45](#)

точной настройкой, [51](#)

шпиндельной головки, [52](#)

рыбой, анализ, [460](#)

бульон, [190](#)

рыбного желатина, [190](#)

желатина-агар, [190](#)

Рыбалка колоний, [253](#)

деление, размножение, [136](#)

ремонта, [81](#)

тепла, [81](#)

тканей, [114](#)

фиксирующих жидкостей, пленок, [82](#)

жгутиков, классификация бактерий по, [136](#)

пятно, [101](#)

колбу богемный, [4](#)

мл, [4](#)

фильтра, [6](#)

Сибасабуро а сыворотке, [6](#)

Колле культуры, [4](#)

колбы и пробирки, чтобы заткнуть, [24](#)

для очистки грязных, [20](#)

новый, [18](#)

стерилизовать, [31](#)

Fleischwasser, [148](#)

жидкость культурах, описание, [271](#)
медиа [146](#)

подножия микроскоп, [50](#)

формальдегида в молоке, Nephner это проверить, [442](#)

формалин способ сохранения культуры, [407](#)
тканей, [404](#)

частичная стерилизация, [33](#)

Френкель и ВОГи решение, [183](#)

Френкель земли буром, [472](#)

замораживание способ по разделам, [115](#)

французская Mannite агар (Сабура), [193](#)
доказательства агар (Сабура), [193](#)

свежих препараты бактерий, [74](#)

: Фридлендер капсула пятно по разделам, [123](#)

Мороза монтажа жидкости, [406](#)

замороженные срезы, экспресс-метод, [116](#)

фуксин, [92](#)
агар (Браун), [205](#)
сульфит агар (Эндо), [206](#)

газовый анализ, качественный, [290](#)
количественные, [290](#)
, собирая аппарат, [291](#)
генераторы, [242](#)
продукции бактериями, [289](#)
трубы для СМИ, [161](#)

Гасперини решение, [193](#)

желатин агар-агар, [193](#)
подготовки, [164](#)
поверхности плиты, [231](#)

общие anæsthetics, [345](#)

генцианвиолет, [91](#)

немецкий линованной бумаги, [69](#)

препаратами, [27](#)

тестирования мощности, [480](#)

прорастания, [140](#)

Geryk воздуха-насос, [43](#)

стеклянный аппарат общего пользования, [3](#)
моется, [18](#)

резки стекла нож, [8](#)

глюкозы в формате агар (Китасато), [180](#)

бульон (Китасато), [180](#)

желатин (Китасато), [180](#)

Glycerinated картофеля, [209](#)

глицерин, агар, [209](#)

крови-сыворотка, [208](#)

бульон, [209](#)

картофельный бульон, [203](#)

бульон, [203](#)

Goadby по желатина, [214](#)

Gonidium, [128](#)

Goniodophore, [128](#)

градуированные капиллярные пипетки, [13](#)
пипетки, [6](#)

грамм-Клавдия разностных пятна, [109](#)

грамм дифференциальных пятно, [108](#)

грамм-Вейгерту по разделам, [121](#), [122](#)

грамм-Вейгерту дифференциальных пятно, [109](#)
изменен, [110](#)

смазки карандашей, [72](#)

группировка бактерий для изучения, [410](#)

охраняемая trephine, [360](#)

Guarnieri агар желатин, [194](#)

морских свинок клетки, [343](#)
держатель, [350](#)

Гулланд решение, [82](#)

десен решения, подготовка, [116](#)

парня культуры бутылки, [5](#)

из гипсовых блоков (Энгель и Хансен), [192](#)

Hæmatin, [95](#)

Hæmatocytometer, [248](#)

Hæmatoxin, [95](#)

Hæmolysin, определение, [326](#)
подготовки, [327](#)
хранения, [331](#)

Hæmolytic сыворотки крови, титрование, [328](#)

висит-блок культуры (Холм), [235](#)

висячая капля культур, [233](#)
экспертизы, [86](#), [79](#)
подготовки, [78](#)
постоянного окрашивания, [80](#)
слайдов, [70](#)

склерозирование тканей, [114](#)

фасоль-агар, [200](#)

бульона, [200](#)

настоя Сена, [200](#)

Hearson воды ванна, [299](#)

тепловой эффект, [299](#)

Nehner тест, [442](#)

Хейман сыворотке агар, [210](#)

Гессе анаэробной культуры способ, [237](#)

гистологического исследования крови, [373](#)

держатель для морских свинок, [350](#)

горячим воздухом, [29](#)

стерилизатор, [30](#)

в использовании, [31](#)

- инкубатора, [217](#)

горячей водой, воронка, [158](#)

человеческой кровяной агар пластины, [250](#)

Huyghenian окуляр, [55](#)

водорода, генерирующего аппарата, [242](#)

в культуре, проверить, [289](#)

перекиси в молоке, проверить, [442](#)

Hyphomycetes, морфологии, [126](#)

копирование, [126](#)

льда-поле для проб воды, [419](#)

мороженое, анализ, [457](#)

источник света для микроскопа, [67](#)

иммунные тела, [393](#)

вакцинации, методы, [321](#)

имперской системы, [492](#)

коэффициентов преобразования, [493](#)

показов фильмов, [85](#)

- инкубаторов, [216](#)

карточки, [336](#), [403](#)

индол, проверить, [286](#)

инфекции, определение, [370](#)

общие замечания при жизни, [371](#)

результатов, [404](#)

влияние среды на рост бактерий, [142](#)

ингаляций, жидкий инокулянт, [365](#)

порошковые закваски [366](#)

коэффициента ингибирования, [310](#), [311](#)

прививки картотека, [336](#)

кожи, [352](#)

внутричерепное, [360](#)

внутримышечные, [355](#)

внутриглазного, [362](#)

внутрибрюшинно, [355](#)

внутрилегочного, [363](#)

внутривенно, [363](#)

коллодия капсулы, [357](#)

подкожно, [353](#)

шприц, [344](#)

Инокулята, характер, [346](#)

подготовки, [346](#)

Inosite-бесплатный медиа—бульон (Дарем), [183](#)

Inseparate токсины, [144](#)

прерывистый стерилизации, [36](#)

внутриклеточные токсины, [144](#)

внутричерепной инокуляции, [362](#)

внутриглазного прививки, [360](#)

Интрагастрального прививки, крупных животных, [367](#)
отметок способ, [367](#)

внутримышечной инокуляции, [355](#)

внутриглазного прививки, [362](#)

внутрибрюшинной инокуляции, [355](#)

Внутрилегочного прививки, [363](#)

внутривенозной инокуляции, [363](#)

в вакууме анаэробия культур, [289](#)

ферменты Инвертин, тесты, [279](#)

инволюции форм, [137](#)

раствором йода, [108](#)

утюг бульон, [185](#)

раствор пептона (Пейкса), [185](#)

изоляции на животных эксперименты, [258](#)

дифференциальной атмосфера, [257](#)

инкубации, [255](#)

СМИ, [255](#)

стерилизации, [256](#)

, разведенного, [248](#)

пластиной культур, [250](#)

субкультур, подготовка, [254](#)

jeffer в их считает диска, [424](#)

Дженнера пятно, [97](#)

Жорес монтажа жидкости, [405](#)

Кайзерлинга фиксирующих растворов, [405](#)

Kanthack сыворотке агар, [211](#)

убил культивации, [318](#)

Киппа водород аппарата, [242](#)

Сибасабуру сыворотке фляжка, [6](#)

Клбс-Loeffler палочки в молоке, [452](#)

паровом стерилизаторе Коха, [34](#)

Kohle культуры колбу, [4](#)

лаборатории ферментов, проверить, [279](#)

лабораторных животных, [335](#)

сравнительный hæmatocytology o, [374](#)

нормальной температуре, [372](#)

правил, [1](#)

лактозы лакмусовая агар (Вюрца), [203](#)

бульон, [203](#)

желатина (Вюрца), [203](#)

лакмус Molke, [203](#)

Лэнг решение, [82](#)

привести бульон, [185](#)

пептон решение, [186](#)

Лейшман пятно, [98](#)

по разделам, [125](#)

Lemsoбыл бульон, [163](#)

Leptothrix, морфологии, [133](#)

смертельная доза минимальна, [316](#)

Leviditi окрашивание способ, [124](#)

, свет, действие, [308](#)

Разжижаемых СМИ, [147](#)

жидкого мыла, [346](#)

литиевый кармин, [96](#)

лакмусовая бульон, [186](#)

желатин, [202](#)

молока культурами, описание, [272](#)

подготовки, [172](#)

nutrose агар (Drigalski-Конради), [205](#)

сыворотки, [195](#)

агар, [196](#)

желатин, [196](#)

(Petruschky), [195](#)

местного anæsthetics, [345](#)

реакция на инфекцию, [372](#)

движение Локомотива, [80](#)

Loeffler капсула пятно, [103](#)

сыворотки, [208](#)

Lophotrichous палочки, [136](#)

Лоррена Смит электрический теплый этапе, [59](#)

сыворотки, [208](#)

раствор Люголя, чтобы подготовиться, [108](#)

лизола, [27](#)

Мак-конки капсула пятно, [99](#)

СМИ, [180](#), [199](#), [205](#)

MacCrorrie капсула пятно, [103](#)

макроскопическое изучение культур, [261](#)

Малахитовый зеленый агар (Loeffler), [207](#)

солодового экстракта раствором (Herschell), [196](#)

рентабельность отдельных колоний, [267](#)

Мартин-фильтрации аппарат, [320](#)

материал для прививки, [346](#)

Майер-альбумин, [120](#)

означает, фенол-коэффициент, [490](#)

измерения бактерии, [61](#)

мяса, бактериологический анализ, [460](#)

экстракт-подготовки, [148](#)

реакция, [149](#)

механическое разделение бактерий, [249](#)

стадия, [52](#)

среды, фильтрация, [156](#)

приготовление, [163](#)

аэробной культуры, [222](#)

эскулинового агара, [204](#)

агар-агара, [167](#)

желатинового агара (Гуарньери), [194](#)

среды, приготовление анаэробной культуры, [180](#)

животных тканей (Фругони), [210](#)

асцитического бульона, [210](#)

жидкого агара (Вассерман), [213](#)

спаржи (Френкеля и Воге), [183](#)

(Ушинского), [183](#)

пивного суслу, [175](#)

свеклы, [200](#)

раствора Бейринка I, [197](#)

II, [198](#)

желчно-солевого агара (Макконки), [205](#)

бульона (Макконки), [180](#)

двойной крепости, [199](#)

кровяного агара (Уошборн), [214](#)

сыворотка крови, [168](#)

(советник и Мэллори), [208](#)

(Леффлер), [208](#)

(Лоррейн-Смит), [208](#)

бульон, [163](#)

хлебный паштет, [193](#)

агар бриллиантово-зеленого цвета (Конради), 206
агар с желчными солями (Фокусс), 206
Капальди-Проскауэр, № I, 186
Нет. Второй, 187
углеводов, 177
carbolised агар, 202
бульон, 202
желатин, 202
морковный, 200
Китай зеленый агар (Werbitski), 207
цитратной крови агар, 171
Кона решение, 191
раствор декстрозы, 178
двойной сахарного агара (Рассел), 207
Земляной солевой агар (Липман и коричневый), 197
яйцо Дорсет, 174
Lubenaui, 209
яйцо-белок, inspissated, 212
(Тарханов и Колесникофф), 212
яичного альбумина агар, 213
бульон (Lipschuetz), 213
английский доказательства агар (Blaxall), 193
рыбный бульон, 190
желатин, 190
агар, 190
жидкость, 146
французский mannite агар (Сабуро), 193

СМИ, подготовка французский доказательства агар (Сабуро), 193
фуксин агар (Браун), 205
сульфит агар (Эндо), 206
желатин, 193
агар, 193
глюкозы в формате агар (Китасато), 180
бульон (Китасато), 180
желатин (Китасато), 180
glycerinated бульон, 209
картофеля, 209
глицерин, агар, 209
крови-сыворотка, 208, 209
бульон, 209
картофельный бульон, 203
гипсовые блоки (Энгель и Хансен), 192
фасоль-агар, 200
бульон, 200
настоя сена, 200

inosite бесплатно-бульон (Дарем), 183
утюг бульон, 185
раствор пептона (Пейкса), 185
лактозы лакмусовая агар (Вюрца), 203
бульон, 203
желатина (Вюрца), 203
лакмус molke, 203
привести бульон, 185
пептон решение, 186
lemsoбыл бульон, 163
разжижаемых, 147
лакмусовая бульон, 186
желатин, 202
молока, 172
nutrose агар (Drigalski-Конради), 205
сыворотки, 195
агар, 196
желатин, 196
(Petruschky), 195
малахитовый зеленый агар (Loeffler), 207
солодового экстракта раствором (Herschell), 196
молока, 172
риса (Айзенберг), 189
(Сойка), 189
набегаешь решение, 191
Naehrstoff агар (Гессен и Niedner), 199

нейтральная лакмусовая решение, 179
нитратный бульон, 185
раствор пептона (Пейкса), 186
питательных веществ, 146
агар-агар, 167

СМИ, подготовка питательного бульона, 163
желатин, 164
nutrose агар (Эйр), 172
олеиновая кислота агар (Флеминг), 201
Omeliantsky это питательная жидкость, 189
Parietti в бульон, 202
Пастернака, 200
Пастера решение, 191
пептон rosolic кислой воды, 186
воды (данам), 177
гипс диски, 192

картофеля, 174
желатина (Эльснер), 204
(Goadby), 214
протеид бесплатно бульон (Uschinsky), 183
rosolic кислоты, пептон решений, 186
сыворотка, бульон, 210
декстроза воды, (шипение), 188
сахара (шипение), 188
воды, 170
сыворотка-агар (Хейман), 210
(Kanthack и Стивенс), 211
(Либман), 212
(Вертгеймер), 211
силикатный желе (Виноградский), 198
твердым, 147
специальных, 182
запас питательных веществ, 163
сахар, 177
агар, 185
(декстроза) бульон, 184
желатин, 184
sulphindigotate агар, 181
бульон (Вейл), 181
желатина (Вейл), 181
ткани (Ногучи), 214
репы, 200
мочи агар, 188
бульон, 187
желатин, 187
(Хеллер), 188
пшеницы бульон (Гасперини), 193
сывороточный агар, 195
желатин, 195
вино должно, 192
Виноградский решение (для азотной организмов), 198
(для закиси организмов), 198
древесной золы агар 201
сусло-агаре, 176
желатин, 176

СМИ, подготовка дрожжей вода (Пастера), 191
стандартизации, 154
хранение, навалом, 159
хранение труб, 161
болячка коробки, 162
титрование, 150

трубопровод питательной, [160](#)

Merismopedia, морфологии, [132](#)

мезофильные бактерии, [143](#)
патогенных воздействий, [315](#)

метаболические конечные продукты, [145](#)

лейкодистрофия гранулы, [136](#)

металлических инструментов, стерилизация, [28](#)

Metatrophic бактерий, [131](#)

методов выращивания, [221](#)
идентификации бактерий, [259](#)
прививки, [352](#)
изоляции, [248](#)
стерилизации, [26](#)

метиленовый-синий, [90](#)

метрической системе, [492](#)
коэффициентов преобразования, [493](#)

Мейер кармин, [96](#)

микробов индикации, [426](#)

микрококки, морфологии, [132](#)

Micrococcus, melitensis в молоке, [456](#)

микрометр, филар, [66](#)
чистый, [63](#)
глазной, [63](#)
этапе, [62](#)

Micrometry, методы, [61](#)

мкм, [61](#)

микроскоп, [49](#)

микроскопическом исследовании бактерий, [86](#)

пятнах, [88](#)

незапятнанным, [86](#)

замечания культур, [272](#)

молока, анализ, качественный, [446](#)

количественные, [444](#)

сжатым виде, анализ, [444](#)

СМИ, [193](#)

подготовки, [172](#)

рис (Айзенберг), [193](#)

(Сойка), [189](#)

образцы, коллекции, [443](#)

осядут трубы, [449](#)

минимальная смертельная доза, [316](#)

зеркало для микроскопа, [55](#)

Меллер пятно на споры, [107](#)

влажной жары, [32](#)

молекулярное движение, [79](#)

Monotrichous палочки, [136](#)

моторики, изучение для, [79](#)

актуально, [80](#)

пресс-форм, осмотр, [126](#)

для парафина врезать, [117](#), [119](#)

монтажная пленка препараты, [85](#)

парафиновых срезах, [119](#)

мышь клетках, [342](#)

держатель, [351](#)

весы, [341](#)

гриба *Mucor mucedo*, [126](#)

Mucorinæ, [126](#)

Мюллера эксикатор, [307](#)

муфельной печи, [28](#)

Мьюирс капсула пятно, [100](#)
жгутиков пятно, [101](#)

музей препараты бактерий, [407](#)
тканей, [404](#)
герметизация, [406](#)

мицелия, [126](#)

Mycoprotein, [135](#)

набегаешь решение, [191](#)

Naehrstoff agar (Гессен и Niedner), [199](#)

пламени, [28](#)

Neisser пятно изменен, [111](#)

продажи микрометр, [63](#)

нейтральной лакмусовой решения, подготовка, [179](#)
красного, [94](#)

нитратный бульон, [185](#)
раствор пептона (Пейкса), [186](#)

азотной организмов в почве, [478](#)

Nitrosoindol реакции, [287](#)

закиси организмов в почве, [477](#)

нормальных средних (*T.стр. Р.*), [372](#)
сыворотки, [375](#)

стволы пожарные, [57](#)
двойная, [58](#)
трехместный, [58](#)

ВМФ анаэробный способ, [244](#)
банки, [245](#)

ядер, испачкать, [105](#)

ядра бактерий, [135](#)

числовая апертура, [56](#)

питательных средах, [146](#)

Nutrose агар (Эйр), подготовка, [172](#)

предмета маркер, [61](#)

целей, [55](#)

косой пробка культур, [223](#)

Окулярного микрометра, [63](#)

окуляров, [55](#)

Oese, платина, [71](#)

Oidium, [128](#)

масла чеснока, [27](#)
горчицы, [27](#)

олеиновая кислота агар (Флеминг), [201](#)

Omeliantsky это питательная жидкость, [189](#)

эксплуатации столы (Эйр), [352](#)
(Татен уже), [351](#)

Opsonic индекс, [393](#)

Opsonic индекс, определение, [390](#)

Opsonin, [387](#)

оптических символов колоний, [267](#)

оптимальная реакция среды, определение, [305](#)
температуры, определение, [298](#)

организмов нагноения, [409](#)

Orsat-выпад газовой аппаратуры, [292](#)

ОРТ Кармине, [96](#)

Оксфорд морилка для актиномицетов, [112](#)

устрицы, анализ, [463](#)

Пейкса' счетный диск, [424](#)
фильтра резервуара, [45](#)

папье Шарден, [158](#)

Паппенгейму пятно, [111](#)

параболоид-конденсор, [60](#)

Parachromophorous бактерий, [144](#)

парафин способ по разделам, [117](#)
секций, монтаж, [119](#)
пятно, [121](#)

Paratrophic бактерий, [131](#)

Parietti в бульон, [202](#)
способ изоляции коли-тифозной группы, [437](#)

Пастернак средний, [200](#)

пассажей вируса, [320](#)

Пастера-Шамберлен фильтра, [42](#)

пипетки Пастера, [10](#)
решения, [191](#)

патогенез, исследование, [315](#)

патогенных бактерий, [131](#)
исследование, [408](#)

Pediosocci, морфологии, [132](#)

Пеницилл, [128](#)

Пептон rosolic кислой воды, [186](#)
воды (данам), подготовка, [177](#)

процентах формула, [496](#)

хлорида ртути, [27](#)

Perisporaceæ, [127](#)

Peritrichous палочки, [136](#)

постоянного препараты бактерий, [407](#)
тканей, [404](#)

Петри блюда, [6](#)

Фагоцитарный индекс, [392](#)

фенола коэффициент, [489](#)
производство, тест, [287](#)

фотогеничный бактерий, [131](#), [144](#)

физиологических фильтр, [156](#)

пикриновой кислоты раствор, [121](#)
(Шпенглера), [112](#)

Picrocarmine, [97](#)

пигмент производства, замечания, [288](#)

пипетки автоматические [13](#)

кровью, [11](#)

капилляров, [10](#)

случаев, в [7](#)

закончил, [6](#)

капилляра, [13](#)

Пастера, [10](#)

седиментации, [16](#)

стандартных закончил, [7](#)

теат [10](#)

дроссельной заслонки, [13](#)

, Чтобы очистить зараженные, [20](#)

новый, [18](#)

стерилизовать, [31](#)

пиридин способ окрашивания *spirochætes*, [124](#)

Pitfield по жгутиков пятно, [103](#)

Плазмолиза, [135](#)

гипс диски, [192](#)

плиты коробке, [7](#)

культурами, описание, [261](#)

подготовки, [226](#)

стенд рихтовки, [228](#)

тарелки, чашки Петри, в [6](#)

, чтобы очистить зараженные, [20](#)

новых, [18](#)

стерилизовать, [31](#)

платиновой иглы, [71](#)

способ крепления, [71](#)

Плеоморфизм, [133](#)

Полярный прорастания, [140](#)

гранул, [136](#)

Polkoerner, [136](#)

многоцветных пятен крови, [97](#)

объединенной сыворотки, [379](#)

фарфоровый фильтр, [42](#)

Berkefeld, [42](#)

Шамберлен, [42](#)

Долтон, [42](#)

вскрытие подопытных животных, [396](#)

картофеля желатина (Эйснер), [204](#)

(Goadby), [214](#)

средних, подготовка, [174](#)

тушенки, анализ, [460](#)

заливке плит, [227](#)

подготовки экспериментальных животных, [335](#)

консервантов в молоке, [442](#)

давления, температуры стол, [500](#)

базовых цветов, действия, [309](#)

Протеид бесплатно бульон (Uchinsky), [183](#)

протеолитические ферменты, тесты, [277](#)

Prototrophic бактерий, [131](#)

Психрофильных бактерий, [143](#)

патогенных воздействий, [315](#)

гной, коллекции, [373](#)

Pyrogallie кислотом растворе, [293](#)

качественный анализ воздуха, [470](#)

молока, [446](#)

сточных вод, [467](#)

почвы, [476](#)

, страдающего мяса, [462](#)

воды, [426](#)

количественный анализ воздуха, [468](#)

молока, [444](#)

сточных вод, [466](#)

почвы, [473](#)

, страдающего мяса, [460](#)

кроличьих клетках, [343](#)

чесотки, лечение, [338](#)

весы, [340](#)

повышения вирулентности микроорганизмов, [320](#)

Рамсден микрометр, [66](#)

диапазоне реакции среды, измерение, [305](#)
температуры, измерение, [298](#)

крысиной клетки, [342](#)

сырое молоко, Сол проверить, [442](#)

реакцией среды, [305](#)
оптимум [305](#)
ассортимент, [305](#)
масштаб, [153](#)

пониженном давлении и температуре стол, [501](#)

восстановителей, производства, [389](#)
тесты, [289](#)

снижение содержания нитратов, [389](#)

Райхерт термо-регулятора, [218](#)

отношении бактерий к окружающей среде, [142](#)

удаления материала из культуральных пробирок, [74](#)

Ренин ферменты, тесты, [279](#)

размножение бактерий, [136](#)

сопротивление стекла, [6](#)
к летальному агентов, [306](#)

покоящиеся формы бактерий, [137](#)

ограничения на экспериментальные прививки, [334](#)

Ribbert капсула пятно, [101](#)

ролл культур, [226](#)

Rosolic кислота Раствор пептона, [186](#)

Rosindol реакции, [286](#)

ру анаэробной культуры способ, [237](#)
культуры бутылки, [5](#)

Сабуро среднего, [193](#)

сахаромицеты, морфологии, [129](#)

Safranine, [94](#)

салициловая кислота в молоке, проверить, [443](#)

гнилостной бактерии, [131](#)

Sarcinæ, морфологии, [132](#)

Саула тест, [442](#)

Весы, десятичной, [340](#)
поездки, [164](#)

скальпели, стерилизовать, [32](#), [33](#)

Schallibaum решение, [121](#)

схема изучения бактерий, [259](#)

Schizomycetes, классификация, [131](#)
морфологии, [131](#)

ножницы, стерилизовать, [32](#)

герметизации музей банки, [406](#)

жгучая утюг, [397](#)

разделы, специальное окрашивание методов, [121](#)

седиментация пипетки, [16](#)
труб, [9](#)

выборе целей, [57](#)

сенсibilизация эритроцитов, [395](#)

серийные разведения, [251](#)

серологическое исследование крови, [378](#)

сывороточного агара (Хейман), [210](#)

(Kanthack и Стивенс), [211](#)

(Либман), [212](#)

плит, [250](#)

(Вертгеймер), [211](#)

бульон, [210](#)

коллекции, [379](#)

декстроза воды (шипение), [188](#)

inspissator, [169](#)

сахара СМН (шипение), [188](#)

воды, Подготовка, [170](#)

сточных вод, анализ, качественный, [467](#)

количественные, [466](#)

встряхнуть культивации, [225](#)

описание, [271](#)

форме колоний, [262](#)

бритья экспериментальных животных, [349](#)

моллюсков, анализ, [463](#)

Силикатный желе (Виноградский), [198](#)

единственным пятном на споры, [106](#)

размер колоний, [262](#)

наклонной трубки культур, [223](#)

горки, чистый новый, [22](#)

использоваться, [23](#)

мазок культуры, [224](#)

описание, [268](#)

жидкое мыло, [346](#)

содовым раствором, хранения на складе, [154](#)

бикарбоната натрия в молоке, проверить, [443](#)

почвы, анализ, качественный, [476](#)
количественные, [473](#)
сбора проб, [471](#)

твердых средах, [147](#)

растворимых токсинов, [144](#)

Сойка молоко риса, [189](#)

копье возглавляемых шпатель, [402](#)

специальных носителях, [182](#)

специфической сыворотки, [379](#)
разведения, [382](#)

сферической аберрации, [55](#)

спириллы, морфологии, [133](#)

Spirochæta, морфологии, [133](#)

Spirochætes в тканях, испачкать, [124](#)

селезенка, экстракт [149](#)

спорангии, [127](#)

споры формирование, arthrogeous, [138](#)
эндогенные, [138](#)
метод, [138](#), [273](#)
прорастания, метод, [140](#), [274](#)
наблюдение, [140](#), [273](#)

споры, символы, [139](#)
классификации, [139](#)
двойное пятно, [106](#)
пятно, [106](#)

стаб культуры, [224](#)
описание, [265](#)

объект-микрометр, [62](#)

микроскопа, [52](#)

окрашивание методов, [90](#)
парафиновых срезах, [121](#)
реакций бактерий, [274](#)

пятна прижизненное, [77](#)
отрицательный (Барри), [77](#)
для шкафа, [72](#)

стандартных градуированные пипетки, [7](#)
содовым раствором, [154](#)

стандартизации СМИ, [154](#)

стандартизации бульон, [155](#)

стафилококки, морфологии, [132](#)

стафилококк в молоке, [456](#)

паровом стерилизаторе, Арнольд, [35](#)
Кох, [35](#)
в использовании, [35](#)
потокное, [35](#)

Sterigma, [127](#)

стерилизации химическими веществами, [27](#)
сухим теплом, [28](#)
фильтрами, [40](#)
влажное тепло, [32](#)
потока пара, [35](#)
перегретым паром, [36](#)
белковых жидкостей, [32](#)
газов, [40](#)

стерилизующие агенты, [26](#)

Stichcultur, [224](#)

запаса, разведения, [497](#)
питательных сред, [163](#)
плиты для изоляции работу, [253](#)

хранения медиа навалом, [159](#)
из камерных СМИ, [161](#)

- магазин коробок для СМИ, [161](#)

серию культуры, [224](#)
описание, [268](#)

потокное движение, [80](#)
пар, [35](#)

Streptobacilli, морфологии, [133](#)

стрептококков в почве, [477](#)
в воде, обнаружение, [432](#)
морфологии, [132](#)

стрептококк пиогенный мышцы в молоке, [455](#)

Streptothrix, морфология, [133](#)

Strichcultur, [223](#)

структуры, внутренних колоний, [265](#)

изучение патогенных бактерий, [408](#)

подкожной инокуляции, [353](#)

субдуральная прививки, [361](#)

Подъярус конденсатор, [54](#)

сахарный агар, [185](#)
декстроза бульон, [184](#)
желатин, [184](#)
средств массовой информации, подготовка, [177](#)

Sulphindigotate agar, [181](#)
бульон (Вейл), [181](#)
желатина (Вейл), [181](#)

сероводорода в культурах, проверить, [290](#)

солнечных лучей, действия, [309](#)

перегретого пара, [36](#)

превосходный коэффициент летальных, [310](#), [313](#)

нагноения, организмы, [409](#)

поверхности персонажи колоний, [264](#)
тарелки, [230](#)

хирургического двигатель, электрический, [360](#)

Рой споры, [127](#)

шприц для подкожной инокуляции из твердого материала, [354](#)
подкожных инъекций, [344](#)

Татен-это операционный стол, [351](#)

таксономии, [262](#)

соска-пипетки, [10](#)

температуры, действия, [299](#)
оптимум [298](#)
манометр, [500](#)
серии, [298](#)
принимая, [340](#)

тестовых объектов для целей, [57](#)

тестирования фильтров, [478](#)

пробирки, [3](#)
, чтобы очистить зараженные, [19](#)
новый, [18](#)
заткнуть, [24](#)
стерилизовать, [31](#)

Tetracosci, морфологии, [132](#)

Тепловой смерти-точка, [143](#)
решимость, [298](#)
спор, [301](#), [304](#)
вегетативных форм, [298](#), [303](#)

термофильных бактерий, [143](#)

Термо-регуляторы, Hearson капсула, [218](#)

Райхерт, в [218](#)

Тионином синий, [92](#)

Thiothrix, морфологии, [133](#)

молотить по воде, собирая бутылки, [418](#)

дроссельной заслонки пипетки, [13](#)

консервы мясо, анализ, [460](#)

ткани среднего (Ногучи), [214](#)

пятна, [95](#)

тканей для разделения, крепления, [114](#)

заморозка, [116](#)

закаливание, [114](#)

врезать, [118](#)

подготовки, [114](#)

стиральная, [115](#)

титрование медиа, [150](#)

Torulæ, дифференциации от сахаромикеты, [130](#)

общей кислотности, [280](#)

токсины, тестирование, [318](#)

Trephines, [360](#)

втройне посеріесе, [58](#)

правда моторики, [80](#)

трубы культур, подготовка, [222](#)

длина, [50](#)

туберкулезной палочки в молоке, [453](#)

пятно, [110](#), [124](#)

туберкулезной Гвинея-свиньи, туши, [454](#)

трубопровод питательных средах, [160](#)

репу СМИ, [200](#)

Унна-Паппенгейму пятно по разделам, [123](#)

необоснованной мясо, анализ, [460](#)

мочи агар, [188](#)

желатин, [187](#)

(Хеллер), [188](#)

СМИ бульон, [187](#)

Uschinsky решение, [183](#)

валентность сыворотками, [386](#)

Ван Ermengem по жгутиков пятно, [104](#)

вегетативной стадии бактерий, [136](#)

Vesuvín, [94](#)

холерный cholerae в молоке, [452](#)

в воде, [439](#)

морфологии, [133](#)

вирулентности, смягчающих, [321](#)

организмов, [320](#)

воспитание, [320](#)

вивисекция лицензии, [334](#)

Voges держатель, [350](#)

эфирные масла в качестве дезинфицирующих средств, [27](#)

теплой стадии, [58](#)

стиральная эритроцитов, [388](#)

тканей, [115](#)

вод, анализ, качественный, [426](#)
количественные, [416](#)
стерилизатор, [33](#)

взвешивания животных, [340](#)

Уэлча капсулы пятно, [101](#)

Вертгеймер сывороточный агар, [211](#)

пшеницы бульон (Гасперини), [193](#)

сывороточный агар, [195](#)
желатин, [195](#)

вино должно, [192](#)

Виноградский решение я, [198](#)
второй, [198](#)

провода ящики для пробирок, [31](#)

древесной золы агар, [201](#)

рабочей пластины, [252](#)

сусло-агаре, [176](#)
желатин, [176](#)

Райта анаэробный способ, [239](#)

дрожжи водой (Пастера), [191](#)

окрашенных по Цилю-Нильсену пятно, [110](#)

Zoogloea, [134](#)

Zymogenic бактерий, [131](#)

КНИГИ СОНДЕРСА

вкл

Патология, Физиология

Гистология, Эмбриология

Бактериология, Биология

W. B. SAUNDERS COMPANY

ПЛОЩАДЬ ЗАПАДНОГО ВАШИНГТОНА В ФИЛАДЕЛЬФИИ

9, ГЕНРИЕТТА-СТРИТ, КОВЕНТ-ГАРДЕН, ЛОНДОН

ЛИТЕРАТУРНОЕ ПРЕВОСХОДСТВО

Безупречный подход, проявленный в публикациях издательства в самом начале его карьеры, и успех используемых им современных методов ведения бизнеса сразу же привлекли внимание ведущих представителей профессии, и многие из самых выдающихся писателей Америки предложили свои книги для публикации. Таким образом, в быстрой последовательности был выпущен ряд работ, которые сразу же вывели издательство в первый ряд медицинских издательств. Достаточно привести такие примеры, как лечение Массера и Келли, хирургия Кина, гинекология и абдоминальная хирургия Келли и Ноубла, дифференциальный диагноз Кэбота, акушерство Де Ли, хирургия Мамфорда, вывихи и переломы суставов Коттона, хирургическое последствие Крэндона и Эренфрида, Ветеринарная анатомия Сиссона, Медицинский диагноз Андерса и Бостона, Запор и непроходимость Ганта, Бактериология Джордана и Кемп желудка, кишечника и поджелудочной железы. Эти книги заняли достойное место среди лучших работ по соответствующей тематике.

Полный каталог наших публикаций будет выслан по запросу

Мэллори

Патологическая гистология

Патологическая гистология. Автор: Фрэнк Б. Мэллори, доктор медицинских наук, адъюнкт-профессор патологии медицинской школы Гарвардского университета. Октаво из 677 страниц, с 497 рисунками, содержащими 683 оригинальных иллюстрации, 124 цветных. Ткань - 5,50 долларов нетто; Половина сафьяна - 7,00 долларов нетто.

ПЕРЕПЕЧАТАНО ЧЕРЕЗ ТРИ МЕСЯЦА

Доктор Мэллори представляет здесь *патологию* с морфологической точки зрения. Он представляет свой предмет биологически, сначала определяя клеточные элементы, из которых состоят различные поражения; затем он прослеживает развитие поражений от простейших до самых сложных. Он так представляет патологию, что вы можете проследить в обратном

направлении от любого данного конечного результата, такого как склероз органа (цирроз печени, например), через все различные острые поражения, которые могут закончиться этим конкретным конечным результатом, к первичной *причине* поражения. *Иллюстрации* очень красивые.

Доктор У. Г. МакКаллум, Колумбийский университет

"Я просмотрел книгу и думаю, что план выполнен превосходно и что книга удовлетворяет потребность, которую мы очень остро ощущали. Я буду очень рад порекомендовать его".

Физиология Хауэлла

Учебник физиологии. Уильям Х. Хауэлл, доктор философии, профессор физиологии в Университете Джона Хопкинса, Балтимор, штат Мэриленд, 1020 страниц, 306 иллюстраций. Ткань, 4,00 доллара нетто.

НОВОЕ (5-е) ИЗДАНИЕ

Доктор Хауэлл имеет многолетний опыт работы преподавателем физиологии в нескольких ведущих медицинских школах и поэтому чрезвычайно хорошо подходит для написания учебника по этому предмету. Основной акцент был сделан на тех фактах и взглядах, которые окажутся непосредственно полезными в практических областях медицины. В то же время, однако, достаточное внимание было уделено экспериментальной стороне науки. Вся литература по физиологии была тщательно изучена доктором Хауэллом, и важные взгляды и выводы были включены в его работу. Иллюстрации использовались наиболее свободно.

The Lancet, Лондон

"Это один из лучших современных учебников по физиологии, и мы горячо рекомендуем его вниманию студентов, которые желают получить, прочитав общий, всесторонний, но краткий обзор объема, фактов, теорий и предположений, составляющих его предмет".

Патологический метод Мэллори и Райта

Пятое Издание

Патологический метод. Практическое руководство для работников патологической гистологии, включающее Указания по проведению вскрытий и клинической диагностике лабораторными методами. Авторы: Фрэнк Б. Мэллори, доктор медицинских наук, адъюнкт-профессор патологии Гарвардского университета; и Джеймс Х. Райт, доктор медицинских наук, директор патологической лаборатории Массачусетской больницы общего профиля. Издание объемом 500 страниц, со 152 иллюстрациями. Ткань, 3,00 доллара нетто.

При подготовке книги к новому изданию авторы учитывали потребности лаборанта, будь то студент, практикующий врач или патолог, в практическом руководстве по гистологическим и бактериологическим методам исследования патологического материала. Многие части были переписаны, добавлено множество новых методов, а количество иллюстраций значительно увеличено.

Бостонский медицинский и хирургический журнал

"Это руководство с момента его первого появления было признано стандартным руководством по патологической технике и стало практически незаменимым для лабораторного работника".

Бактериологическая технология Эйра

Бактериологическая техника. Лабораторное руководство для студентов медицинских, стоматологических и технических специальностей. Автор: Дж. У. Х. Эйр, доктор медицины, Ф. Р. С. Эдин, директор бактериологического отделения больницы Гая, Лондон. Октаво из 520 страниц, 219 иллюстраций. Ткань, 3,00 доллара нетто.

ПРОСТО ГОТОВО —НОВОЕ (2d) ИЗДАНИЕ, ПЕРЕПИСАННОЕ

Доктор Эйр подвергла свою работу самому тщательному пересмотру. Действительно, его переработка была настолько тщательной, что всю книгу, увеличенную примерно на 150 страниц и 50 иллюстраций, пришлось переделывать от корки до корки. Он включил все новейшие технические достижения в каждый раздел предмета. Его скрупулезность, аккуратность, его внимание к деталям делают его работу важной. Он четко описывает технику бактериологического исследования воды, сточных вод, воздуха, почвы, молока и продуктов из него, мяса и т.д. И он дает вам хорошую технику - методы, подтвержденные его собственным большим опытом. Любому, кто интересуется этим направлением деятельности, необходимо новое издание работы доктора Эйра. Иллюстрации столь же практичны, как и текст.

Патология Макфарланда

Учебник патологии. Джозеф Макфарланд, доктор медицинских наук, профессор патологии и бактериологии Медико-хирургического колледжа Филадельфии. Том объемом 856 страниц с 437 иллюстрациями, многие цветные. Ткань, 5,00 долларов нетто; Половина сафьяна, 6,50 долларов нетто.

НОВОЕ (2d) ИЗДАНИЕ

Вы не сможете успешно лечить болезнь, если не будете обладать практическими, *клиническими* знаниями о патологических изменениях, вызванных болезнью. Для этой цели хорошо подходит работа доктора Макфарланда. Она была написана именно с такой целью — предоставить готовые средства для получения основательной подготовки по предмету, такой подготовки, которая могла бы ежедневно помогать вам в вашей практике. В этом издании каждая страница была тщательно проработана, исправлены, опущены устаревшие и добавлены новые. Некоторые разделы были полностью переписаны. Вы найдете, что с этой книгой стоит ознакомиться, поскольку это работа авторитетного специалиста.

Медицинский журнал Святого Павла

"Можно с уверенностью сказать, что мало кто более квалифицирован для изложения современных взглядов на этот предмет, чем Макфарланд. Тема полностью соответствует действительности".

Бостонский медицинский и хирургический журнал

"В нем содержится огромная масса хорошо классифицированных фактов. Один из лучших разделов посвящен специальной патологии крови".

Биология Макфарланда: медицинская и общая

Биология: медицинская и общая— Джозеф Макфарланд, доктор медицинских наук, профессор патологии и бактериологии в Медико-хирургическом колледже Филадельфии. 12mo, 457 страниц, 160 иллюстраций. Ткань, 1,75 доллара нетто.

ПРОСТО ГОТОВО—НОВОЕ (2d) ИЗДАНИЕ

Эта работа относится одновременно к *общей* и *медицинской* биологии. Первое потому, что в нем обсуждается особая природа и реакции живого вещества в целом; второе потому, что особое внимание уделяется тем предметам, которые представляют особый интерес и ценность в изучении и практике медицины. Иллюстрации окажут вам большую помощь.

Фредерик П. Горэм, доктор медицинских наук, Университет Брауна.

"Я очень доволен этим. Возможно, самая высокая оценка, которую я могу дать этой книге, - это сказать, что она больше, чем любая другая работа, приближается к курсу общей биологии, который я сейчас читаю".

Патогенные бактерии и простейшие Макфарланда

Патогенные бактерии и простейшие. Джозеф Макфарланд, доктор медицинских наук, профессор патологии и бактериологии Медико-хирургического колледжа Филадельфии. Октаво из 878 страниц, прекрасно иллюстрированный. Ткань, 3,50 доллара нетто.

НОВОЕ (7-е) ИЗДАНИЕ, ДОПОЛНЕННОЕ

Доктор Макфарланд подвергла свою книгу самой тщательной переработке, доведя это издание до мельчайших деталей. Важные дополнения увеличили его объем примерно на 180 страниц. Безусловно, наиболее важным дополнением является включение совершенно нового раздела о *патогенных простейших*. В этом разделе рассматриваются все простейшие, патогенные для человека; и тем же четким, определенным образом, который обеспечил работе Макфарланда место на самом переднем крае медицинской бактериологии. Иллюстрации - лучшие, какие только есть в мире, и прекрасно выполнены.

Х. Б. Андерсон, доктор медицинских наук,, профессор патологии и бактериологии, Медицинский колледж Тринити, Торонто.

"Книга удовлетворительная, и я с удовольствием порекомендую ее студентам Тринити-колледжа".

The Lancet, Лондон

"Он превосходно адаптирован для студентов-медиков и практикующих врачей, для которых он, по общему признанию, написан.... Приведенные описания точны и удобочитаемы".

Гистология и органография Хилла

Руководство по гистологии и органографии. Автор Чарльз Хилл, доктор медицины, бывший доцент кафедры гистологии и эмбриологии Северо-Западного университета, Чикаго. 12то из 468 страниц, 337 иллюстраций. Гибкая кожа, 2,00 доллара нетто.

НОВОЕ (2d) ИЗДАНИЕ

Работа доктора Хилла отличается полнотой изложения, редко встречающейся в книге такого объема. Особое внимание уделяется полости рта и зубам.

Медицинский журнал Пенсильвании

"Он устроен таким образом, чтобы к нему было легко получить доступ и понять. Всем, кто задумывается об изучении гистологии и органографии, мы бы порекомендовали эту работу".

**ПОЛУЧИТЕ НОВЫЙ
ЛУЧШИЙ СТАНДАРТНЫЙ
Американский
иллюстрированный словарь**

Новое (7—е) издание -5000 продано за два месяца

Американский иллюстрированный медицинский словарь. Новый и полный словарь терминов, используемых в медицине, хирургии, стоматологии, фармации, химии, ветеринарии, сестринском деле и смежных отраслях; с более чем 100 новыми и тщательно проработанными таблицами и множеством красивых иллюстраций. Автор: У. А. Ньюман Дорланд, доктор медицины, редактор "Американского карманного медицинского словаря". Большой октаво, 1107 страниц, в плотном кожаном переплете. Цена, \$ 4,50 нетто; с указательным пальцем, \$5,00 нетто.

ОН ОПРЕДЕЛЯЕТ ВСЕ НОВЫЕ СЛОВА — ОН АКТУАЛЕН

Американский иллюстрированный медицинский словарь определяет сотни новейших терминов, не имеющих определения ни в одном другом словаре—bar none. Эти новые термины - живые, активные слова, взятые прямо из современной медицинской литературы.

Здесь указаны заглавные буквы и произношение всех слов. Это определяет происхождение или этимологию слов. В некоторых словарях этимология занимает лишь второстепенное место, во многих случаях производное вообще не приводится. В американском иллюстрированном издании практически каждому слову дано свое происхождение.

Каждому слову выделен отдельный абзац, что упрощает быстрый поиск нужного слова.

Таблицы артерий, мышц, нервов, вен и т.д. Оказывают величайшую помощь в обобщении анатомических фактов. В них классифицирована для быстрого изучения вся необходимая информация о различных сооружениях.

Каждому слову дается определение — определение, которое *определяет* как можно меньшим количеством слов. В некоторых словарях сотни слов вообще не имеют определения, отсылая читателя к какому-либо другому источнику за нужной ему информацией сразу.

Говард А., Келли, доктор медицины, Университет Джона Хопкинса, Балтимор.

"Американский иллюстрированный словарь достоин восхищения. Он так хорошо составлен и такого удобного размера. Никаких ошибок в моем использовании обнаружено не было".

Дж. Коллинз Уоррен, доктор медицины, доктор права, F.R.C.S. (с отличием), Гарвардская медицинская школа

"Я рассматриваю это как ценное подспорье к моей литературной работе по медицине. Это очень полное издание удобного размера, с которым удобно обращаться. Я предпочитаю его любому другому".

Учебник патологии Штенгеля

Пятое Издание

Учебник патологии. Альфред Штенгель, доктор медицинских наук, профессор медицины Пенсильванского университета. Объем Octavo составляет 979 страниц, с 400 текстовыми иллюстрациями, многие в цветах, и 7 цветными таблицами на всю страницу. Ткань, 5,00 долларов нетто; Овца или половина сафьяна, 6,50 долларов нетто.

СОДЕРЖИТ 400 ВЫРЕЗОК ТЕКСТА, МНОГИЕ ЦВЕТНЫЕ, И 7 ЦВЕТНЫХ ТАБЛИЧЕК

В этой работе практическое применение патологических фактов в клинической медицине рассматривается более полно, чем это принято в работах по патологии. Хотя предмет патологии рассматривается в самом широком смысле, соответствующем объему книги, была предпринята попытка представить предмет с точки зрения клинициста. Во второй части работы патология отдельных органов и тканей рассматривается систематически и достаточно полно в подзаголовках, которые четко указывают на предмет, который можно найти на каждой странице. В этом издании раздел, посвященный общей патологии, был наиболее тщательно переработан, несколько важных глав были практически переписаны.

The Lancet, Лондон

"Цель этого тома - представить предмет патологии в максимально возможной практической форме, и особенно с точки зрения "клинического патологоанатома". Эти задачи были добросовестно выполнены, и результатом является ценный учебник. Мы можем наиболее благосклонно рекомендовать ее нашим читателям как основательно практический труд по клинической патологии".

Физиология питания Стайлза

Физиология питания. Автор: Перси Голдтуэйт Стайлз, доцент кафедры физиологии Симмонс-колледжа в Бостоне. 12 иллюстраций на 295 страницах. Ткань, 1,25 доллара нетто.

ИЛЛЮСТРИРОВАННЫЙ

Эта новая работа выражает самые передовые взгляды на этот важный предмет. В ней в сжатой форме рассматриваются процессы пищеварения и метаболизма. Ключевым словом всей книги является "энергия" — ее источник и способ его сохранения.

"Он примечателен тонкостью дикции и четким изложением предмета, кое—где дополняемым слегка юмористическими оборотами речи, которые просто восхитительны". -*Колин К. Стюарт, доктор философии, Дартмутский колледж.*

Общая бактериология Джордана

Учебник общей бактериологии. Автор: Эдвин О. Джордан, доктор философии, профессор бактериологии Чикагского университета и Медицинского колледжа Раш. Иллюстрированный октаво из 623 страниц. Ткань, 3,00 доллара нетто.

НОВОЕ (3d) ИЗДАНИЕ

Работа профессора Джордана охватывает всю область бактериологии, рассматривая как непатогенные, так и патогенные бактерии, уделяя, конечно, больше внимания последним. Имеются обширные главы о методах изучения бактерий, включая окрашивание, биохимические тесты, культивирование и т.д.; о развитии и составе бактерий; о ферментах и продуктах ферментации; о бактериальном производстве пигмента, кислоты и щелочи; и о птоминах и токсинах. Особенно полно представлена сыворотка для лечения гонореи, дифтерии, дизентерии и столбняка. Связь туберкулеза крупного рогатого скота с туберкулезом человека и глазная туберкулиновая реакция широко изучаются.

Эта работа также заинтересует студентов-академиков. Он содержит главы о бактериологии растений, молока и молочных продуктов, воздуха, сельского хозяйства, воды, пищевых консервантов, процессов дубления кожи, вяления табака и изготовления уксуса; связи бактериологии с домашним хозяйством и санитарной техникой и т.д.

Проф. Расчет Беррейдж, адъюнкт-профессор санитарных наук Университета Пердью.

"Я очень впечатлен полнотой и точностью этой книги. Она, безусловно, освещает ситуацию более полно, чем любая другая американская книга, которую я видел".

Ветеринарная бактериология Бьюкенена

Ветеринарная бактериология. Автор: Роберт Э. Бьюкенен, доктор философии, профессор бактериологии в Колледже сельского хозяйства и механических искусств штата Айова. Octavo, 516 страниц, 214 иллюстраций. Ткань, 3,00 доллара нетто.

ЛУЧШИЕ ПУБЛИКАЦИИ

Профессор Бьюкенен подробно описывает все бактерии, вызывающие болезни домашних животных. Он подробно рассматривает иммунитет, опсонический индекс, репродукцию, стерилизацию, антисептики, биохимические тесты, питательные среды, выделение культур, производство различных токсинов, антитоксинов, туберкулинов и вакцин, доказавших свою диагностическую или терапевтическую ценность. Затем, помимо собственно бактерий и простейших, он считает патогенными для животных плесень, мильдью, головню, ржавчину, поганки, слоеные шарики и другие грибы.

Б. Ф. Каупп, д.В.Н., *Государственный сельскохозяйственный колледж, Форт-Коллинз.*

"Это лучшее издание по данной теме. Что меня больше всего радует, так это то, что в нем собраны все последние результаты исследований. Это утоляет давнюю потребность".

Эмбриология Гейслера

Учебник эмбриологии. Автор: Джон К. Хейслер, доктор медицинских наук, профессор анатомии Медико-хирургического колледжа Филадельфии. Том объемом 435 страниц, с 212 иллюстрациями, 32 из них цветные. Ткань, 3,00 доллара нетто.

ТРЕТЬЕ ИЗДАНИЕ — С 212 ИЛЛЮСТРАЦИЯМИ, 32 ЦВЕТНЫЕ

В этом издании представлены все достижения, достигнутые за последнее время в науке эмбриологии. Многие разделы были полностью переписаны и добавлено много нового и важного. Также был представлен ряд новых иллюстраций, которые окажутся очень ценными. "Эмбриология" Хейслера стала стандартной работой.

Г. Карл Хубер, доктор медицины, *профессор эмбриологии в Институте Вистар Пенсильванского университета.*

"Я нахожу это издание "Учебника эмбриологии" доктора Хейслера улучшенным по сравнению с предыдущим. Добавленные цифры значительно повышают ценность работы. Я снова рекомендую ее нашим студентам".

Гистология Бема, Давидовфа, и Хубера

Учебник гистологии человека. Включая технику микроскопии. Авторы: доктор А. А. Бем и доктор М. Фон Давидовф из Мюнхена, а также Г. Карл Хубер, доктор медицинских наук, профессор эмбриологии в Институте Вистар Пенсильванского университета. Красивый том объемом 528 страниц с 361 красивой оригинальной иллюстрацией. Гибкая ткань, 3,50 доллара нетто.

ВТОРОЕ ИЗДАНИЕ, ДОПОЛНЕННОЕ

Работа докторов Бема и Давидовфа хорошо известна по немецкому изданию и считается одной из наиболее практически полезных книг по гистологии человека. Это второе издание было в значительной степени переписано и значительно дополнено доктором Хубером, который также

добавил более ста оригинальных иллюстраций. Обширные дополнения доктора Хубера сделали эту работу наиболее полным учебником для студентов по гистологии из всех существующих.

Бостонский медицинский и хирургический журнал

"Это, несомненно, учебник первого разряда, тщательно написанный настоящими мастерами предмета, и в определенных направлениях он намного превосходит любое другое руководство по гистологии".

Химическая патология уэллса

Химическая патология.—Обсуждение общей патологии с точки зрения вовлеченных химических процессов. Автор Х. Гидеон Уэллс, доктор философии, доцент кафедры патологии Чикагского университета. Октаво из 616 страниц. Ткань, 3,25 доллара нетто.

ПРОСТО ГОТОВО—НОВОЕ (2d) ИЗДАНИЕ

Работа доктора Уэллса написана для врачей, для тех, кто занимается исследованиями в области патологии и физиологической химии, а также для студентов-медиков. Во вводной главе обсуждаются химия и физика животной клетки, приводятся основные факты об ионизации, диффузии, осмотическом давлении и т.д., а также связь этих фактов с клеточной активностью. Специальные главы посвящены *диабету*, а также *метаболизму мочевой кислоты и подагре*.

У. Х. Уэлч, доктор медицинских наук, профессор патологии Университета Джона Хопкинса.

"Эта работа восполняет реальную потребность в английской литературе по очень важному предмету, и я буду рад рекомендовать ее своим студентам".

Элементы питания от Lusk

Элементы науки о питании. Грэм Ласк, доктор философии, профессор физиологии медицинской школы Корнелла. Объем в 302 страницы. Ткань, 3,00 доллара нетто.

НОВОЕ (2d) ИЗДАНИЕ —ПЕРЕВЕДЕНО НА НЕМЕЦКИЙ

Профессор Ласк представляет научные основы, на которых зиждутся наши знания о питании и обмене веществ, как в отношении здоровья, так и в отношении болезней. Существуют специальные главы, посвященные метаболизму при диабете и лихорадке, а также метаболизму пуринов. Работа также окажется полезной для изучающих *диетологию животных* на сельскохозяйственных станциях.

Льюэллис Ф. Баркер, доктор медицинских наук, профессор принципов и практики медицины, Университет Джона Хопкинса.

"Я буду очень рекомендовать это моим студентам. Приятно иметь такое обсуждение предмета на английском языке".

Экономическая зоология Догерти

Экономическая зоология. Л. С. Догерти, магистр, доктор философии, профессор зоологии Государственной нормальной школы, Кирксвилл, Миссури, и М. К. Догерти, автор совместно с Джексоном книги "Сельское хозяйство через лабораторию и школьный сад". Часть I: *Полевое и лабораторное руководство*. 12то из 237 страниц с чередованием. Ткань, 1,25 доллара нетто. Часть II: *Принципы*. 12 иллюстраций на 406 страницах. Ткань, 2,00 доллара нетто.

ИЛЛЮСТРИРОВАННЫЙ

Другой такой книги нет. В нем приводятся не только важнейшие факты структурной зоологии и развития различных ветвей животных, но и естественная история — *жизнь и привычки* — таким образом, демонстрируются взаимосвязи структуры, привычек и окружающей среды. Одним словом, в ней излагаются принципы зоологии и *их фактическое применение*. Особое внимание уделяется экономической фазе.

Часть I — *Руководство по полевым и лабораторным работам*— предназначена для практического обучения в полевых условиях и лаборатории. Чтобы повысить его ценность, для этой цели вставляются пустые страницы для заметок.

Зоология беспозвоночных Дрю

Лабораторное руководство по зоологии беспозвоночных. Автор: Гилман А. Дрю, доктор философии, помощник директора Морской биологической лаборатории, Вудс-Хоул, Массачусетс. С помощью бывших и нынешних сотрудников зоологического отдела инструкторов. 12то из 213 страниц. Ткань, 1,25 доллара нетто.

ПРОСТО ГОТОВО—НОВОЕ (2d) ИЗДАНИЕ

Предмет изложен логически, и был применен типовой метод изучения, поскольку этот метод был преобладающим на протяжении многих лет.

Профессор. Эллисон А. Смит-младшая, Политехнический институт Вирджинии

"Я думаю, что это лучшее лабораторное руководство по зоологии, которое я когда-либо видел. Большое количество рассмотренных формуляров делает эту работу применимой практически к любому населенному пункту".

Сердечная патология Норриса

Исследования в области кардиальной патологии. Автор: Джордж У. Норрис, доктор медицинских наук, младший медицинский сотрудник Пенсильванского университета. Большой октаво из 235 страниц с 85 превосходными иллюстрациями. Ткань, \$ 5,00 нетто.

ПРЕВОСХОДНЫЕ ИЛЛЮСТРАЦИИ

Широкий интерес, проявляемый к поражениям сердца, делает эту книгу особенно подходящей. Иллюстрации превосходны и точно воспроизводят сфотографированные образцы. Каждая иллюстрация сопровождается подробным описанием; кроме того, рисунки дополнены большим

количеством буквенной печати. В работе переплетен значительный материал диагностического и терапевтического характера.

Бостонский медицинский и хирургический журнал

"Иллюстрации расположены таким образом, чтобы проиллюстрировать все распространенные и многие редкие поражения сердца, а сопровождающий их описательный текст представляет собой довольно продолжительный дидактический трактат".

Патология Макконнелла

Руководство по патологии. Автор: Гатри Макконнелл, доктор медицинских наук, профессор бактериологии и патологии в Университете Темпл, Филадельфия. 12-е из 523 страниц со 170 иллюстрациями. Гибкая кожа, 2,50 доллара нетто.

НОВОЕ (2d) ИЗДАНИЕ

Доктор Макконнелл обсуждал свой предмет с ясностью и точностью стиля, что делает работу очень полезной как для студента, так и для практикующего врача. Иллюстрации приведены из-за их практической ценности.

Медицинский журнал штата Нью-Йорк

"В книге тема патологии рассматривается с тщательностью, которой не хватает многим работам с большими претензиями. Иллюстрации — многие из них оригинальные — изобильны и отличаются исключительным совершенством".

Патология Гектоена и Рисмана

Американский учебник патологии. Под редакцией Людвиг Хектоена, доктора медицинских наук, профессора патологии Медицинского колледжа Раш, Чикаго; и Дэвида Рисмана, доктора медицинских наук, профессора клинической медицины поликлиники Филадельфии. Октаво из 1245 страниц, 443 иллюстрации, 66 цветных. Ткань, 7,50 долларов нетто; Половина марокко, 9,00 долларов нетто.

Специальная патологическая гистология Дюрка и Гектоена

Атлас и справочник по специальной патологической гистологии. Доктор Х. Дюрк из Мюнхена. Отредактировано с дополнениями Людвигом Гектоеном, доктором медицины, профессором патологии Медицинского колледжа Раш, Чикаго. В двух частях. Часть I. Кровеносный, дыхательный и желудочно-кишечный тракты. 120 цветных рисунков на 62 табличках и 158 страниц текста. Часть II. —Печень, мочевыводящие и половые органы, нервная система, кожа, мышцы и кости. 123 цветных рисунка на 60 пластинах и 192 страницы текста. За часть: ткань, 3,00 доллара нетто. *В серии рукописных атласов Сондерса.*

Большая ценность этих пластин заключается в том, что они точно передают цветом эффект окрашивания, который имеет такое большое значение для дифференциации тканей. Текстовая

часть книги достойна восхищения, и, несмотря на краткость, она полностью удовлетворяет тем, что основные факты изложены, причем так, что читатель чувствует, что он всесторонне изучил предмет.

Уильям Х. Уэлч, доктор медицинских наук, профессор патологии, Университет Джона Хопкинса, Балтимор.

"Я считаю "Атлас специальной патологической гистологии" Дюрка под редакцией Гектоена очень полезной книгой для студентов и других специалистов. Тарелки просто восхитительны".

Соботта и гистология человека Хубера

Атлас и воплощение гистологии человека. Автор: приват-доцент доктор Дж. Соботта из Вюрцбурга. Под редакцией с дополнениями Г. Карла Хубера, доктора медицины, профессора гистологии и эмбриологии Мичиганского университета в Анн-Арборе. С 214 цветными фигурами на 80 пластинах, 68 текстовыми иллюстрациями и 248 страницами текста. Ткань, 4,50 долларов нетто. В серии рукописных атласов Сондерса.

ВКЛЮЧАЯ МИКРОСКОПИЧЕСКУЮ АНАТОМИЮ

Работа сочетает в себе обилие хорошо подобранных и максимально точных иллюстраций с кратким текстом, причем таким образом, что делает ее одновременно атласом и учебником. Подавляющее большинство иллюстраций было сделано из срезов человеческих тканей, и всегда из свежих и во всех отношениях нормальных образцов. Цветные литографские пластины были изготовлены с использованием более чем тридцати цветов.

Бостонский медицинский и хирургический журнал

"По цвету и пропорциям они отличаются приятной точностью и литографской красотой".

Босанке о спирохетах

Спирохеты: Обзор недавних работ с некоторыми оригинальными наблюдениями. У. Сесил Босанкет, доктор медицины, член Королевского колледжа врачей, Лондон. Иллюстрированный том на 152 страницах. 2,50 доллара нетто.

ИЛЛЮСТРИРОВАННЫЙ

Это полная и авторитетная монография о спирохетах, содержащая морфологию, патогенез, классификацию, окрашивание и т.д. Также рассматриваются псевдоспирохеты, и весь текст хорошо проиллюстрирован. Высокий авторитет доктора Босанкета в этой области исследований делает эту новую работу особенно ценной.

Клиническая бактериология Леви и Клемперера

Элементы клинической бактериологии. Доктора Эрнст Леви и Феликс Клемперер из Страсбургского университета. Переведено и отредактировано Августом А. Эшнером, доктором

медицинских наук, профессором клинической медицины, поликлиника Филадельфии. Объем в 440 страниц, полностью иллюстрированный. Ткань, 2,50 доллара нетто.

С. Солис-Коэн, доктор медицинских наук, профессор клинической медицины, Медицинский колледж Джефферсона, Филадельфия.

"Я считаю это превосходной книгой. Я рекомендовал ее своим студентам".

Бактериология Лемана, Неймана, и Уивера

Атлас и воплощение бактериологии: включая учебник специальной бактериологической диагностики. Авторы: проф. д-р К. Б. Леманн и д-р Р. О. Нойманн из Вюрцбурга. *Из второго исправленного и дополненного немецкого издания.* Отредактировано с дополнениями Г. Х. Уивером, доктором медицинских наук, доцентом кафедры патологии и бактериологии Медицинского колледжа Раш, Чикаго. В двух частях. Часть I.—632 цветных рисунка на 69 литографских листах. Часть II. -511 страниц текста с иллюстрациями. За часть: ткань, 2,50 доллара нетто. *В серии рукописных атласов Сондерса.*

Общая патологическая гистология Дюрка и Гектоена

Атлас и справочник по общей патологической гистологии. Составлен доктором Х. Дюрком из Мюнхена. Отредактировано с дополнениями Людвигом Хектоеном, доктором медицины, профессором патологии в медицинском колледже Раш, Чикаго. 172 цветных рисунка на 77 литографских листах, 36 вырезок текста, многие цветные, и 353 страницы. Ткань, \$ 5,00 нетто. *В серии "Атлас рук" Сондерса.*

Американский учебник физиологии Второе издание

Американский учебник физиологии. В двух томах. Под редакцией Уильяма Х. Хауэлла, доктора философии, профессора физиологии в Университете Джона Хопкинса, Балтимор, Мэриленд. Два иллюстрированных издания royal octavo объемом около 600 страниц каждое. За объем: Ткань, 3,00 доллара нетто; Половина сафьяна, 4,25 доллара нетто.

"Эта работа будет считаться справочным пособием по физиологии. Для тех, кто желает знать состояние современной физиологии, кто ожидает получить предложения относительно дальнейших физиологических исследований, мы не знаем ни одного на английском языке, который в такой степени отвечал бы такому требованию ". —*The Medical News.*

"Патология и терапия" Уоррена, Второе издание

Хирургическая патология и терапия. Автор: Джон Коллинз Уоррен, доктор медицинских наук, почетный профессор хирургии Гарвардской медицинской школы. Octavo, 873 страницы, 136 рельефных и литографических иллюстраций, 33 цветных. С приложением о научных пособиях по хирургической диагностике и серией статей по региональной бактериологии. Ткань, 5,00 долларов нетто; Половина сафьяна, 6,50 долларов нетто.

Бактериология Горэма

Лабораторный курс бактериологии. Для студентов медицинских, сельскохозяйственных и промышленных специальностей. Автор: Фредерик П. Горэм, доктор медицинских наук, адъюнкт-профессор биологии в Университете Брауна, Провиденс, Южная Каролина и др. 12 книг объемом 192 страницы с 97 иллюстрациями. Ткань, 1,25 доллара нетто.

"Одно из лучших лабораторных руководств для студентов по изучению бактериологии на рынке.... Технология полностью современная и вполне достаточная для всех практических целей". —*Американский журнал медицинских наук*.

Новое (3d) издание "Физиологии Рэймонда"

Физиология человека. Джозеф Х. Рэймонд, доктор медицинских наук, профессор физиологии и гигиены, больница колледжа Лонг-Айленд, Нью-Йорк. Октаво из 685 страниц с 444 иллюстрациями. Ткань, 3,50 доллара нетто.

"Книга хорошо составлена и напечатана, и ее можно рассматривать как заслуживающее доверия руководство для студента и полезную справочную работу для врача общей практики. Иллюстрации многочисленны и хорошо выполнены". —*The Lancet*, Лондон.

Седьмое издание книги Болла "Бактериология", Переработанное

Основы бактериологии: краткое и систематическое введение в изучение микроорганизмов. Автор М. В. Болл, доктор медицины, ныне покойный бактериолог больницы Святой Агнессы, Филадельфия. 12 экземпляров на 289 страницах, со 135 иллюстрациями, некоторые цветные. Ткань, 1,00 доллара нетто. *В серии вопросов-подборок Сондерса*.

"Технические рекомендации в отношении носителей, окрашивания, монтажа и т.п. взяты из последних авторитетных работ". —*The Medical Times*, Нью-Йорк.

Новое (3d) издание книги Баджетта "Физиология"

Основы физиологии. Подготовлено специально для студентов-медиков и снабжено вопросами после каждой главы. Автор: Сидни П. Баджетт, доктор медицинских наук, бывший профессор физиологии Вашингтонского университета, Сент-Луис. Отредактировано Хэваном Эмерсоном, доктором медицинских наук, демонстратором физиологии Колумбийского университета. иллюстрированный том 12то объемом 250 страниц. Ткань, 1,00 доллара нетто. *Серия вопросов Сондерса*.

"У него отличное представление о своем предмете.... Это одна из самых удовлетворительных книг в этом классе" —*Медицинский вестник Пенсильванского университета*.

Гистология Лероя Новое (4-е) издание

Основы гистологии. Луи Лерой, доктор медицинских наук, профессор гистологии и патологии, Университет Вандербилта, Нэшвилл, Теннесси. 12то, 263 страницы, с 92 оригинальными иллюстрациями. Ткань, 1,00 доллара нетто. *В серии вопросов-подборок Сондерса*.

"Работа в ее нынешнем виде является образцом того, какой должна быть помощь студенту; и мы без колебаний заявляем, что практикующий врач также мог бы ознакомиться с книгой непреходящей пользы". — *Медицинский мир*, Филадельфия.

Медицинский тезаурус Бартон и Уэллса

Словарь медицинских слов и фраз. Уилфред М. Бартон, доктор медицинских наук, доцент кафедры Materia Medica и терапии, и Уолтер А. Уэллс, доктор медицинских наук, демонстратор ларингологии, Джорджтаунский университет, Вашингтон, Округ Колумбия 12mo, 534 страницы. Гибкая кожа, 2,50 доллара нетто; указательный палец, 3,00 доллара нетто.

Американский карманный словарь Нового (8-го) издания

Карманный медицинский словарь Дорланда. Под редакцией В. А. Ньюмана Дорланда, доктора медицины, редактора "Американского иллюстрированного медицинского словаря". Содержит произношение и определения основных слов, используемых в медицине и смежных науках, с 64 обширными таблицами. 677 страниц. Эластичная кожа с золотыми краями, 1,00 доллара нетто; с лакированным указательным пальцем, 1,25 доллара нетто.

"Я могу безоговорочно рекомендовать это нашим студентам". — Дж. Х. Холланд, доктор медицины, из *Медицинского колледжа Джефферсона*, Филадельфия.